

THAIZA CAMPELO BRAGA

**AVALIAÇÃO RENAL E HEPÁTICA DE POEDEIRAS COMERCIAIS EM PICO DE  
PRODUÇÃO ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO SUBDOSES DE  
MICOTOXINAS**

RECIFE

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B813a Braga, Thaiza Campelo  
Avaliação renal e hepática de poedeiras comerciais em pico de produção alimentadas com dietas contendo subdoses de micotoxinas / Thaiza Campelo Braga. - 2021.  
86 f. : il.
- Orientadora: Francisco de Assis Leite Souza.  
Coorientadora: Priscilla Maria Cavalcante Rocha.  
Inclui referências e anexo(s).
- Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, 2021.
1. bioquímica sérica. 2. fungos. 3. lesão hepática. 4. lesão renal. 5. histopatologia. I. Souza, Francisco de Assis Leite, orient. II. Rocha, Priscilla Maria Cavalcante, coorient. III. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**THAIZA CAMPELO BRAGA**

**AVALIAÇÃO RENAL E HEPÁTICA DE POEDEIRAS COMERCIAIS EM PICO DE  
PRODUÇÃO ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO SUBDOSES DE  
MICOTOXINAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza

Co-orientadora: Dra. Priscilla Maria Cavalcante Rocha

RECIFE

2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO RENAL E HEPÁTICA DE POEDEIRAS COMERCIAIS EM PICO DE  
PRODUÇÃO ALIMENTADAS COM DIETAS CONTENDO SUBDOSES DE  
MICOTOXINAS**

Dissertação de Mestrado elaborada por

**THAIZA CAMPELO BRAGA**

Aprovada em 26 de fevereiro de 2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza  
Orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Juliana Fortes Vilarinho Braga – Membro  
Departamento de Ciências Animais - UFRSA

---

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

*Dedico à pesquisa pública que resiste ao atual governo opressor. A ciência que é indissociável ao homem. A nossa força potencializadora para transformar o mundo.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ser maravilhoso, perfeito e necessário em todas as circunstâncias da minha vida. Estás acima de todas as coisas.

Ao meu orientador Francisco de Assis Leite Souza, pela disposição, confiança, comprometimento e contribuição essencial para conclusão da pesquisa. Foi uma honra ser aluna de um excelente professor e orientador.

A minha co-orientadora Priscilla Maria Cavalcante Rocha, pelas ideias inovadoras, habilidades e compromisso com a pesquisa, por todo amor e carinho oferecido e por ser uma grande inspiração em minha vida.

Aos meus colegas de trabalho, Sivonaldo Silva, Eleutério Silva, Fábio Silva, Antonio Ferreira e ao meu chefe Antonio Araújo, pela contribuição essencial da Granja Enavis com a pesquisa e desenvolvimento do projeto.

Aos meus queridos amigos e colaboradores para conclusão do trabalho, José Anderson e Jessica Maria, obrigada por tudo. Sem vocês jamais teria conseguido.

Aos anjos que Deus colocou na pesquisa para me ajudar de maneira grandiosa e extremamente necessária, Edna Barros, Bruno Paiva, Wanessa Noadya e Leandro Aguiar, obrigada por tudo.

A minha família por compreender e me ajudar a ter estímulo para alcançar meus sonhos.

Aos meus amigos que me apoiavam e aconselhavam.

E a minha Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela oportunidade de desenvolver a pesquisa.

A conquista e méritos são de todos nós.

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”*  
Isaac Newton

## RESUMO

Os grãos possuem importante papel no sistema produtivo como ingrediente base nas dietas de animais. Interferências de safra, falhas de manejo dos grãos no campo e principalmente sua armazenagem inadequada, propiciam a vulnerabilidade desses grãos à ação de fungos. Os impactos provocados por fungos dentro da cadeia produtiva acarretam a baixa rentabilidade da produção dos animais em razão da menor qualidade e produtividade da matéria prima. As micotoxinas que estão mais comumente relacionadas ao impacto no sistema produtivo avícola são as toxinas T2, fumonisinas e aflatoxinas. Considerando-se a importância da qualidade de matéria prima fornecida às aves e a existência de poucos trabalhos realizados com poedeiras comerciais, além da ausência da análise da dinâmica de desencadeamento das micotoxicoses por tempo prolongado, este trabalho teve por objetivo estudar o efeito cumulativo de multimicotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas e toxina T-2) em poedeiras comerciais no período de 32 a 68 semanas de idade, durante a fase de pico de produção. Para isto, em uma granja de poedeiras comerciais na região Agreste do estado de Pernambuco, foram coletadas amostras das rações fabricadas e analisadas através da técnica de imunocromatografia para detecção de tricotecenos (toxina T-2), aflatoxinas e fumonisinas. Mensalmente, foram selecionadas cinco aves ao acaso de cada grupo de aves (A, B e C), posteriormente as aves foram eutanasiadas e coletadas amostras de sangue, fígado e rim. O sangue foi centrifugado para a obtenção do soro para análise de testes bioquímicos séricos de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, albumina, creatina quinase, proteínas totais, ácido úrico, colesterol e uréia. Os fragmentos de rim e fígado foram processados por técnicas histológicas para posterior análise histopatológica. Os resultados de análise de micotoxinas presentes em rações fabricadas consistiram em valores abaixo dos níveis recomendados para poedeiras e caracterizando subdosagem durante todo estudo. As lesões histopatológicas renais encontradas foram glomerulopatia membranoproliferativa, membranosa e proliferativa, hiperemia, nefrite, nefrose, necrose e proteinose tulares. As lesões histopatológicas hepáticas encontradas consistiram em esteatose, degeneração vacuolar, hepatite, hipertrofia e microgranuloma de células de Kupffer, necrose de hepatócitos e proliferação de ductos biliares. Nas análises de bioquímica sérica foram apresentadas normalidades nos testes de ácido úrico, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase. Os testes de proteína total, creatina quinase e uréia obtiveram níveis superiores e o teste de albumina obteve níveis inferiores aos recomendados para poedeiras. Sugere-se que existe efeito progressivo e cumulativo das lesões renais e hepáticas em função da idade das aves, correlacionada diretamente com o tempo de exposição e ingestão de multimicotoxinas.

**Palavras-chave:** bioquímica sérica, fungos, lesão hepática, lesão renal, histopatologia.

## ABSTRACT

Grains play an important role in the production system as a basic ingredient in animal diets. Due to crop interferences, grains handling failures in the field and mainly their inadequate storage, they provide vulnerability of these grains to the action of fungi. The impacts caused by fungi within the production chain lead to low profitability of animal production due to the lower quality and productivity of the raw material. The mycotoxins that are most commonly related to the impact on the poultry production system are T2 toxins, fumonisins and aflatoxins. Considering the importance of the quality of raw material supplied to birds and the existence of few studies carried out with commercial laying hens, in addition to the absence of analysis of the dynamics of triggering mycotoxicosis for a prolonged period, this study aimed to study the cumulative and synergistic effect of mycotoxins in laying hens for a period of 32 to 68 weeks of age, during the peak production phase. For this, in a commercial laying hen farm in the Agreste region of the state of Pernambuco, samples of the manufactured rations were collected and analyzed using the immunochromatography technique to detect trichothecenes (T2), aflatoxins and fumonisins. Monthly, five birds were selected at random from each group of birds (A, B and C), afterwards the birds were euthanized and collected from liver and kidney blood samples. The blood was centrifuged to obtain the serum for analysis of serum biochemical tests of aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, albumin, creatine kinase, total proteins, uric acid, cholesterol and urea. The kidney and liver fragments were processed by histological techniques for further histopathological analysis. The results of analysis of mycotoxins present in manufactured diets consisted of lower values than the levels recommended for layers and characterizing underdosing throughout the study. The histopathological renal lesions found were membranoproliferative, membranous and proliferative glomerulopathy, hyperemia, nephritis, nephrosis, necrosis and tular proteinosis. The histopathological liver lesions found consisted of steatosis, vacuolar degeneration, hepatitis, hypertrophy and microgranuloma of Kupffer cells, hepatocyte necrosis and bile duct proliferation. Serum biochemistry analyzes showed normality in uric acid, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase tests. The total protein, creatine kinase and urea tests obtained higher levels and the albumin test obtained lower levels than those recommended for layers. It was observed that there is a progressive and cumulative effect of kidney injuries depending on the age of the birds, directly correlated with the time of exposure and ingestion of mycotoxins. It is suggested that there is a progressive and cumulative effect of kidney and liver damage as a function of the age of the birds, directly correlated with the time of exposure and ingestion of multimycotoxins.

**Keywords:** fungi, histopathology, kidney injury, liver injury, serum biochemistry.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO

- Figura 1. Fotomicrografia do fígado de aves. (A) Degeneração gordurosa, HE, =barra 50  $\mu\text{m}$ ; (B) Necrose de hepatócitos, HE, =barra 50  $\mu\text{m}$ ; (C) Infiltrado, HE, =barra 50  $\mu\text{m}$ ; (D) Microgranuloma de células de Kupfer, HE =barra 50  $\mu\text{m}$ ..... 51
- Figura 2. Fotomicrografia do rim de aves. (A) Glomerulonefrite, HE, =barra 50  $\mu\text{m}$ ; (B) Necrose tubular, HE, =barra 50  $\mu\text{m}$ ; (C) Nefrite, HE, =barra 50  $\mu\text{m}$ ; (D) Nefrose, HE =barra 50  $\mu\text{m}$ ..... 52

**LISTA DE TABELAS****REVISÃO DE LITERATURA**

Tabela 1. Limites máximos recomendados pelo Laboratório de análises de micotoxinas (LAMIC), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS para aves de produção .....	18
Tabela 2. Delineamento experimental .....	41
Tabela 3. Formulação de dieta base para as rações de poedeiras entre 32 a 68 semanas.....	42
Tabela 4. Escore de lesão para avaliação histopatológica de acordo com o grau de intensidade e distribuição.....	27

**LISTA DE QUADROS****ARTIGO**

Quadro 1. Valores de micotoxinas quantificados e qualificados em rações de aves entre 32 e 68 semanas de idade .....	42
Quadro 2. Frequência relativa (%) e absoluta de alterações histopatológicas no rim de aves poedeiras comerciais com idades entre 32 e 68 semanas alimentadas com dietas contendo subdoses de micotoxinas.....	42
Quadro 3. Frequência relativa (%) e absoluta de alterações histopatológicas no fígado de aves poedeiras comerciais com idades entre 32 e 68 semanas alimentadas com dietas contendo subdoses de micotoxinas.....	42
Quadro 4. Bioquímica sérica dos parâmetros renais e hepáticos em poedeiras comerciais entre 32 e 68 semanas alimentadas com dietas contendo subdoses de micotoxinas.....	43

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

AFB1- Aflatoxina B1

ALT- Alanina Aminotransferase

AST- Aspartato Aminotransferase

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAL- Fosfatase Alcalina

HE- Hematoxilina Eosina

PAS- Ácido periódico + reativo de Schiff

$\gamma$ -GT- Gamaglutamiltransferase

LAMIC- Laboratório de análises para micotoxinas

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

T-2- Toxina T-2

UFRPE- Universidade Federal Rural de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 OBJETIVO GERAL .....	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
3.1 MICOTOXINAS.....	18
3.3.1 Aflatoxinas .....	19
3.3.1 Fumonisinias .....	20
3.3.1 Tricotecenos .....	21
3.2. QUALIDADE DE MATÉRIA PRIMA E RAÇÕES.....	21
3.3 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EM AVES E SUA RELAÇÃO COM MICOTOXINAS.....	23
3.4 USOS DE ADSORVENTES EM RAÇÕES.....	24
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
4.1 LOCAL .....	25
4.2 DELINEAMENTO .....	25
4.3 ANÁLISE DE MICOTOXINAS NAS RAÇÕES.....	26
4.4 COLETA DE AMOSTRAS.....	27
4.5 ANÁLISE DE BIOQUÍMICA SANGUÍNEA .....	27
4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	27
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>5 REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>6 ARTIGO</b> .....	36
6.1. Poedeiras comerciais alimentadas a longo prazo com dietas contendo subdoses de micotoxinas podem apresentar lesão renal e hepática?	
<b>7 ANEXOS</b> .....	53
7.1 LICENÇA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	53
7.2 NORMAS DE FORMATAÇÃO DE ARTIGO PARA SUBMISSÃO À REVISTA TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION.....	54

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema agropecuário brasileiro tem como destaque a cultura de grãos para alimentação humana e animal e, por consequência das atividades desempenhadas para fortalecimento econômico nacional, torna-se um colaborador importante para o desenvolvimento da balança comercial brasileira (SOUZA et al., 2017).

A avicultura, com o desenvolvimento das indústrias, conseguiu conquistar diversos espaços produtivos nas mais diversas regiões do território brasileiro decorrente principalmente do aumento do consumo e demanda comercial (BELUSSO, 2010), levando esta atividade a também contribuir para a balança comercial e sistema agropecuário brasileiro.

O ovo é considerado um dos alimentos mais acessíveis pelo mercado consumidor e sua principal aquisição, desde sua domesticação, é de aves comerciais e caipiras (CARNEIRO, 2012). A produção de ovos pode ser destinada para vários setores, como as empresas de incubatórios, reprodução e melhoramento genético das aves para indústrias avícolas de corte e postura, e para o consumo direto e/ou indireto na alimentação humana. O ovo é uma fonte barata de proteínas, gorduras, vitaminas, e minerais de boa qualidade, além disso, possui ação nas atividades contra microrganismos e na qualidade imunológica. Sua composição nutricional quando comparada com a de outros alimentos, somada ao custo para o consumo fazem dele uma ótima opção de alimento nutritivo (TERRA, 1999).

Para atender a demanda dos consumidores ao sistema de produção avícola, as condições climáticas do país permitem o plantio de várias culturas, como a soja, o milho, o sorgo, o trigo e entre outras de ampla importância econômica e social que permitem a continuidade e abastecimento do sistema produtivo. Porém, mesmo com esse crescimento produtivo, alguns fatores limitam sua expansão como, por exemplo, a presença de toxinas liberadas por fungos, conhecidas como micotoxinas (SIMAS et al., 2007).

A qualidade dos grãos, independentemente do seu destino, pode estar comprometida por diversas falhas de técnicas de produção e armazenamento. Uma das principais interferências na qualidade dos grãos é a presença de micotoxinas em estímulos de estresse, principalmente as produzidas por fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicilium* (HERMANNNS et al., 2006). Dessa forma, os impactos provocados por estes fungos dentro da cadeia produtiva acarretam a baixa rentabilidade da produção dos animais em razão da menor qualidade e produtividade da matéria prima. Além disso, o aumento dos custos para o

produtor com tratamentos e profilaxias é alto, pois os metabólitos tóxicos dos fungos causam efeitos deletérios aos animais (BERTHILLER et al., 2007).

A colonização por fungos em matérias primas fornecidos para alimentação animal pode ser de diversas formas. Estudos já realizados apontam que as fases de desenvolvimento do grão, colheita e armazenamento são determinantes para o crescimento de fungos e conseqüentemente, produção de micotoxinas (OLDENBURG et al., 2017). Durante as mais variadas etapas de processamento de grãos, as micotoxinas se mostram resistentes e não diminuem seu nível de toxicidade (ALIM et al., 2018; MARTINS et al., 2018; OUESLATI et al., 2018).

As rações são compostas por várias outras fontes nutricionais, como por exemplo, milho, milho, soja e trigo, sendo que muitas delas também podem conter uma ou mais micotoxinas, que somadas com a cronicidade de ingestão do alimento se tornam ainda mais preocupantes para o desencadeamento das micotoxicoses (OLDENBURG et al., 2017; ASTOLFI et al., 2012).

Diferentemente dos frangos de corte, as poedeiras permanecem por um maior período no sistema produtivo e por este motivo, tem mais chances de receber matéria prima de diferentes safras e armazenagens, ou seja, mais predispostas ao consumo de alimentos contaminados e, conseqüentemente, aos efeitos deletérios das micotoxicoses em toda sua vida produtiva. Considerando-se a importância da qualidade de matéria prima fornecida às aves e a existência de poucos trabalhos realizados com poedeiras comerciais, além da ausência de análise da dinâmica de desencadeamento das micotoxicoses por tempo prolongado, é de relevância estudos detalhados sobre o efeito cumulativo e sinérgico das micotoxinas em poedeiras comerciais por um período mais amplo de investigação.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito cumulativo de multimicotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas e toxina T-2) sob as alterações morfofuncionais do rim e do fígado de poedeiras comerciais em diferentes idades em pico de produção.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as alterações bioquímicas e histopatológicas do fígado de poederias comerciais com idade entre 32 e 68 semanas alimentadas com dietas contendo subdoses de multimicotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas e toxina T-2);
- Avaliar as alterações bioquímicas e histopatológicas dos rins de poederias comerciais com idade entre 32 e 68 semanas alimentadas com dietas contendo subdoses de multimicotoxinas (aflatoxinas, fumonisinas e toxina T-2);

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 MICOTOXINAS

Micotoxinas são metabólitos secundários do metabolismo fúngico que podem ocorrer durante o processo de produção e armazenamento de grãos ou forragens. Os metabólitos são geralmente associados a um grupo de fungos pertencentes aos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais crescem em forragens e grãos, tanto no campo como durante o armazenamento (DAWSON, 2001).

Estudos já revelaram que pelo menos 300 metabólitos fúngicos sejam altamente tóxicos para humanos e animais (DEVEGOWDA, 1998; TESSARI, 2005). Segundo Osuna (1989), as consequências da ingestão de rações contaminadas por essas toxinas promovem a redução drástica da produtividade, caracterizada por diminuição da velocidade de crescimento e uma baixa eficiência alimentar. A contaminação de alimentos por micotoxinas é frequente na indústria e apresenta importância em saúde pública, principalmente nos países emergentes em que a exposição à aflatoxina está relacionada com aproximadamente 40% das doenças que acometem humanos e animais (WILLIAMS, 2004).

As exposições às micotoxinas acontecem cotidianamente através da aquisição e consumo de alimentos vegetais, cereais e de origem animal (BULLERMAN, 1986). A contaminação atinge maior escala nos cultivos em climas quentes, úmidos e tropicais, mas existe variabilidade ao decorrer dos anos (IARC, 1976; PROGRAM, 2011). Este tipo de toxina interfere potencialmente nos processos enzimáticos dos nutrientes e ainda possuem efeito imunossupressor (REDDY, 1982). Além de provocarem efeitos deletérios aos animais, as micotoxinas conseguem ser transferidas para os produtos dos animais, como o ovo, por exemplo (REDDY, 1982)

Isto é de grande importância para a saúde pública uma vez que, o consumo de produtos de origem animal contendo metabólitos fúngicos caracteriza um risco também para a saúde humana (JOBIM, 2001). Dessa forma, pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 274 de 15 de outubro de 2002 e pela Portaria do Ministério da Agricultura nº 183 de 21 de março de 1996, os níveis aceitáveis de micotoxinas na matéria prima destinada a alimentação animal são de 20 µg para Aflatoxinas e T2 e 200 µg para fumonisinas. A maioria dos estudos desenvolvidos sobre as micotoxicoses na avicultura foram através de experimentos com frangos de corte cujos sinais clínicos consistiram em: hepatite aguda, anemia, diarreia, desidratação, termorregulação prejudicada, aumento de mortalidade, hemorragia, lesões renais e hepáticas, distúrbios neurais, lesão oral, redução no

ganho de peso, crescimentos reduzidos e imunidade reduzida (DIAZ, 2016). Dentre as micotoxinas presentes tanto em grãos quanto em rações que mais comumente estão relacionadas aos decréscimos produtivos e prejuízos na sanidade avícola afetando o desempenho dos animais, são a aflatoxina, toxina T-2 e fumonisina (BRYDEN, 2012; MURUGESAN, 2015; WIELOGÓRSKA, 2016).

As micotoxinas possuem potencial toxigênico, causando doenças chamadas de micotoxicoses, a partir da ingestão de qualquer alimento contaminados por estas toxinas (KEMPKEN; ROHLFS, 2010).

As micotoxinas podem ser ingeridas, inaladas ou absorvidas através da pele (FUJII et al., 2004). Sua ação pode promover diminuição progressiva da atividade motora, infertilidade e doenças neurológicas, principalmente em bovinos, ovinos, suínos e aves (FUJII et al., 2004).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que determinou a quantidade máxima de micotoxinas presentes nos alimentos para a sua comercialização (ANVISA, 2011). Quanto aos níveis máximos tolerados de micotoxinas para aves de produção, são obedecidos de acordo com o quadro abaixo:

**Tabela 1.** Limites máximos recomendados pelo Laboratório de análises de micotoxinas (LAMIC), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS para aves de produção.

Categoria	Toxinas (ppb)		
	Aflatoxina	Tricotecenos	Fumonisina
Frango Inicial	0	0	100
Frango Crescimento	2	50	500
Frango Final	5	50	500
Poedeiras	10	100	1000
Matrizes	10	100	1000

### 3.1.1 Aflatoxinas

As aflatoxinas (AFL) fazem parte de um grupo de metabólitos secundários produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (KURTZMAN, 1987). Esses fungos podem ser encontrados em grãos de milho com alta incidência em ambientes de armazenamento com umidade relativa em torno de 13% a 18% (PINOTTI, 2016).

Essa toxina é capaz de afetar o metabolismo dos lipídios de reserva energética das aves, com aparecimento de palidez das aves e esteatose hepática, resultante da diminuição

da lipase pancreática e secreção biliar afetando absorção dos lipídeos e principalmente os carotenoides que são responsáveis pela pigmentação da pele e da gema dos ovos (RUIZ, 2011; GOMES, 2014). Uma das alterações no metabolismo lipídico é a esteatorréia ou excreção aumentada de lipídeos que pode ser facilmente detectada na presença de partículas integras de ração nas fezes das aves, ou seja, a aflatoxicose provoca a má absorção (OSBORNE & HAMILTON, 1981). Essa má absorção prejudica a eficiência de conversão alimentar e, conseqüentemente, aumenta o custo da produção podendo ser severa, com o aumento de até dez vezes o teor de gordura no material fecal (SCHAEFFER & HAMILTON, 1991). Além disso observa-se, que as aves que consomem aflatoxinas em suas dietas apresentam-se com palidez de mucosas, diminuição no transporte e deposição tecidual dos carotenóides da dieta (LEESON, 1995).

Estudos comprovaram que os sinais de intoxicação por aflatoxinas eram mais severos em aves quando esses eram alimentados com uma dieta de baixo nível proteico em comparação com aqueles que recebiam uma dieta normal de proteínas, ou seja, as proteínas obtiveram um efeito protetor contra a aflatoxina (SISK & CARLTON, 1972). Dessa forma, pode-se afirmar que aves desafiadas por aflatoxinas necessitam de uma suplementação mais elaborada de proteínas para a obtenção de um determinado nível de produtividade. Contudo os sinais da aflatoxicose ainda são subclínicos e se desenvolvem afetando o desempenho zootécnico, provocando maior conversão alimentar com conseqüente diminuição no crescimento e ganho de peso, digestão ineficiente dos ingredientes da ração devido ao comprometimento da integridade intestinal, baixa produtividade de ovos e queda nos níveis sanguíneos de proteínas e lipídeos (MURUGESAN, 2015; BRYDEN, 2012).

Como diagnóstico, as análises sorológicas através da quantificação das enzimas hepáticas e proteínas séricas podem contribuir para detecção da aflatoxicose uma vez que essas enzimas foram alteradas em decorrência do comprometimento hepático (KANEKO, 2008).

### 3.1.2 Fumonisinias

As fumonisinias são metabólitos originados de compostos secundários produzidos pelos fungos, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*. As aves intoxicadas por fumonisinias apresentam diminuição significativa no ganho de peso e aumento da conversão alimentar; aumento no peso dos rins e fígado; e aumento na concentração de hemoglobina (WEIBKING, 1993).

O mecanismo de ação dessas toxinas é verificado pelo bloqueio na síntese dos

esfingolipídios, substância importante para a integridade da membrana celular e transporte iônico através das células (WANG, 1991). Dessa forma, eles são predominantes no sistema nervoso central e periférico, localizados nos oligodendrócitos e células de Schwann (WANG, 1991).

Assim como nas demais micotoxinas, as fusariotoxinas presentes nos grãos de milho, são causadoras de fusariotoxicoses e promovem lesões orais que progridem para lesões com necrose e descamação que, de acordo com o tempo de exposição, predis põem ao aparecimento de lesões orais com evolução para lesões graves no intestino e órgãos como o fígado (ZACHARIASOVA, 2014).

### 3.1.3 Tricotecenos

Os tricotecenos são produzidos por vários gêneros de fungos, contudo, o gênero *Fusarium*, é responsável pela maioria dos sinais clínicos de redução do desempenho, necrose de tecidos linfoides, empenamento anormal, depreciação da qualidade das cascas dos ovos e lesões orais (REIS, 2012).

A fusariotoxina toxina T-2 tem elevada ação sobre as mucosas pela ativação da inflamação crônica prejudicando a produtividade das aves devido as lesões na mucosa da via oral e língua, ou ulcerações no palato e na comissura do bico dificultando o consumo de alimento (KOSICKI, 2016). Além de afetar as mucosas, em situações mais graves podem provocar hepatomegalia, assim como possíveis erosões no ventrículo e proventrículo e intestinos, levando a hemorragia e morte (MARIN et al., 2013; KOSICKI et al., 2016).

A intoxicação por toxina T-2 pode ocasionar comprometimento metabólico, redução de consumo de alimento, anemia, imunossupressões, alterações sanguíneas, com hemorragias causadas por fatores relacionados a coagulação do sangue; e neurotoxicidade (HUFF, 1992).

## 3.2. QUALIDADE DE MATÉRIA PRIMA E RAÇÕES

Existem diversos tipos de culturas de grãos que são destinadas a alimentação animal, dentre elas destacam-se o milho e o milheto. São plantas com abrangente cultivo nacional, tendo a avicultura como maior consumidora desses cereais. O milho ainda representa a maior parcela de consumo, sustenta a economia rural e representa a principal *commodity* que dá equilíbrio ao comércio dos grãos (DEMÉTRIO, 2008; TONIN, 2009; FUMAGALI, 2017). O milheto é capaz de suprir as exigências nutricionais dos animais devido aos maiores teores de proteínas. Além disso, sua cultura é eficaz na utilização de água,

necessitando de até 70% menos água que a cultura do milho para produzir a mesma quantidade de matéria seca (SOBRINHO, 2009).

Apesar de serem culturas de destaque produtivo, ambas enfrentam dificuldades de garantir sua qualidade e eficiência após os processos de armazenagem, impactando negativamente a produção de aves. Essa armazenagem é ainda mais preocupante quando os grãos no momento da colheita estão úmidos. Isso se deve ao fato de predispor a maior ação microbiológica dos fungos, que necessitam de umidade para se desenvolver (MEDINA et al., 2015). A umidade aumenta a incidência de riscos para quebra e mofos nos grãos, diminuindo seus níveis nutricionais e aumentando os níveis de toxinas (STRINGHINI et al., 2014).

Mesmo com dificuldades de garantia de qualidade, os custos no sistema produtivo com alimentação na avicultura de postura industrial representam cerca de 75% dos custos totais de produção. Desses valores, aproximadamente 85% correspondem aos níveis energéticos e proteicos da dieta garantidos na matéria prima (SIBBALD, 1980). O consumo de alimentos pelas aves é geralmente controlado pelo nível energético da dieta e esta, deve conter todos os nutrientes necessários para as exigências de manutenção e produção, ou seja, ingredientes inofensivos que não depreciem os níveis de exigências nutricionais. O estabelecimento de correlação entre a necessidade energética e o consumo de alimentos é o ponto fundamental da formulação prática de rações, uma vez que quando essa relação é pré-determinada, a ingestão dos nutrientes é alcançada (SIBBALD, 1980).

As galinhas poedeiras são animais mais sensíveis aos efeitos adversos que podem ocorrer com o consumo de alimentos contaminados que podem ser associados principalmente a uma redução drástica da produtividade, caracterizada por diminuição da velocidade de crescimento e uma baixa conversão alimentar (OSUNA, 1989). O efeito negativo deve-se ao desequilíbrio dos diversos sistemas enzimáticos ligados ao processo digestivo e do metabolismo dos nutrientes, além do efeito imunossupressor (REDDY, 1982).

A formulação de dietas e rações fabricadas para aves e suínos consomem em média 60% dos grãos de milhos colhidos, os 40% são utilizados para consumo direto ou processamento de alimentos para a alimentação humana (GONÇALVES, 2003). As rações são formuladas para atender à exigência nutricional das aves e conseqüentemente os níveis energéticos estão baseados na qualidade da matéria prima. Para ser efetivo, é necessário unir a qualidade sanitária e nutricional (TAHIR, 2012).

A qualidade nutricional dos grãos é verificada por sua composição química de acordo

com as Tabelas Brasileiras de Alimentos para Aves e suínos (ROSTAGNO et al., 2017) o milho produz grãos com média de amido (73,5%), proteína (9%), lipídeos (4,3%), açúcares (1,9%), minerais (1,5%), porém esses valores são dependentes da eficiência de colheita, manejo, safra e armazenagem. A qualidade física dos grãos também é de grande importância e está correlacionada com a qualidade nutricional e sanitária que, através da Instrução Normativa 60 de 2011 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, classifica o milho em 3 tipos:

Tipo 1: apresentam 1% de grãos ardidos, 6% de grãos avariados, 3% grãos quebrados, 1% com presença de matérias estranhas e impurezas e 2% de carunchos.

Tipo 2: possui cerca de 2% de grãos ardidos, 10% de grãos avariados, 4% de grãos quebrados, 1,5% com matérias estranhas e impurezas, 3% carunchados.

Tipo 3: tem 3% de grãos ardidos, 15% de grãos avariados, 5% de grãos quebrados, cerca de 2% de matérias estranhas e impurezas e 4% de carunchos.

A qualidade sanitária dos grãos está relacionada com a presença de microrganismos como fungos e bactérias, que depreciam o valor nutricional do grão através de alterações químicas de metabólitos de bactérias e micotoxinas liberadas pelos fungos (ABDOLLAHI et al., 2010). Os fungos conseguem colonizar os grãos muito antes de sua colheita, são numerosos, resistentes às variações de temperatura e persistentes em silos das fábricas de rações causando alterações físicas, visuais, e organolépticas na ração, além de apresentar toxidez aos animais (UBIALI et al., 2011; RUIZ et al., 2011; MURUGESON et al., 2015).

### 3.3 BIOQUÍMICA SANGUÍNEA EM AVES E SUA RELAÇÃO COM MICOTOXINAS

A avaliação da bioquímica sérica pode contribuir para o diagnóstico de enfermidades e na profilaxia de tratamento para diversas enfermidades na produção avícola. Contudo, estudos sobre o papel fisiológico e avaliações quanto aos parâmetros laboratoriais são pouco estudados (SCHIMIDT et al., 2007). As análises são realizadas no soro ou no plasma sanguíneo (SCHIMIDT et al., 2007) principalmente com o intuito de avaliar funções como a hepática, muscular e renal (CANDIDO, 2008).

Com os resultados das alterações é possível investigar por exemplo, os padrões das proteínas, ácido úrico, colesterol, além de direcionar a uma melhor investigação diagnóstica em órgãos como o fígado, rins e músculos (SCHIMIDT et al., 2007).

Os valores de creatinina plasmática refletem a capacidade de filtração renal, sendo assim, seu aumento direciona a deficiência na funcionalidade dos rins (GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

As concentrações das proteínas plasmáticas totais nas aves são menores do que nos mamíferos, variando de 2,5 a 4,5 g/dL. A albumina representa de 40 a 50% da proteína plasmática total das aves (teores normais variam de 0,8 a 2,0 g/dL), na insuficiência hepática há diminuição significativa dos valores das proteínas totais concomitantemente à diminuição da proporção albumina/globulinas (SCHIMIDT, et al., 2007). Um dos agentes que podem alterar os valores das proteínas totais são as aflatoxinas pois se ligam com constituintes intracelulares da célula hepática, como o DNA e RNA, dificultando a síntese de proteínas (SANTURIO, 2000).

O colesterol em sua forma endógena é feito principalmente pelo fígado onde nas concentrações plasmáticas para a maioria das espécies de aves variam de 100 a 250 mg/dL (SCHIMIDT, et al., 2007).

Dentre as enzimas hepáticas na bioquímica sérica podemos citar a alanina-aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico pirúvica (TGP) e aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) (BORSA et al., 2006).

A aspartato aminotransferase (AST) é uma enzima citoplasmática e mitocondrial que nas aves sua atividade é alta no fígado (TRAESEL, 2009). Assim, em situação de lesões hepáticas, intoxicação ou infecção, a atividade da AST e ALT sérica aumenta (NELSON e COX, 2011). Sendo assim, os valores de AST acima de 275 UI/L pode estar relacionado a distúrbios hepáticos e/ou musculares, e valores acima de 800 UI/L são altamente sugestivos de dano hepático severo (SCHIMIDT et al., 2007). Furlan et al. (1999) estabeleceram para frangos de corte da linhagem comercial Ross o nível de 112 mg/dL de colesterol, 332 UI/L e 5,7 UI/L para os parâmetros de AST e ALT, respectivamente.

### 3.4 USOS DE ADSORVENTES EM RAÇÕES

A introdução de compostos adsorventes inertes em rações tem sido muito importante no processo de detoxificação das dietas, pois são produtos que uma vez degradados não produzem substâncias tóxicas, reduzindo as micotoxinas na dieta sem afetar o valor nutricional da mesma (MALLMANN, 2006).

Com habilidade de integração física às micotoxinas, os adsorventes tem a finalidade de impedir a absorção das toxinas no intestino e são excretados juntamente com as toxinas nas fezes (OLVER, 1997).

Com a ampla variabilidade de micotoxinas e conseqüentemente suas estruturas químicas diferentes (COLVERO, 2008), o maior critério de escolha de um bom adsorvente é

a sua capacidade de sequestrar o maior número de compostos secundários de fungos (SWAMY et al., 2005). As argilas são um produto extremamente selecionado e processado e amplamente difundido por sua eficiência de adesão das micotoxinas (MALLMANN et al., 2006). Dentre as argilas utilizadas no mercado podemos citar: sepiolita, aluminossilicato de sódio e cálcio (bentonitas), diatomitas.

Fisicamente, o processo de ligação do adsorvente às micotoxinas é através da carga elétrica por troca iônica, sendo assim, as argilas possuem grande afinidade para essa função sequestrante (DIAZ et al., 2002). Contudo, as argilas podem adsorver algumas vitaminas e minerais e os glucomananos esterificados de paredes de leveduras surgiram como proposta de um composto que oferece uma grande superfície de adsorção as micotoxinas, mas que necessitam de mais estudos (BÜNZEN e HAESE, 2006).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 LOCAL

Este estudo foi conduzido sob os termos e condições dos princípios éticos da experimentação animal, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) aprovado junto à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco sob licença número 069/2019.

O experimento foi realizado em três galpões de uma granja de poedeiras comerciais, todos localizados na cidade de Orobó-PE a 120 km do Recife, durante os meses de setembro de 2019 a junho de 2020. Foram utilizados três galpões convencionais, automatizados, com 420 cm<sup>2</sup>/ave na gaiola, ambos com orientação leste-oeste, não climatizados.

### 4.2. DELINEAMENTO

Neste estudo foram utilizadas um total de 150 aves, das linhagens Dekalb (A), Bovans (B) e Lohmann Lite (C), todas vacinadas contra Doença de Marek, Doença de Gumboro, Doença de Newcastle, Coriza Aviária, Pneumovirose, Bronquite infecciosa, encefalomielite aviária, Micoplasmose e Bouda Aviária.

As aves alojadas nos aviários foram acompanhadas durante seu período de pico de produção entre 32 e 68 semanas de idade. Cada lote, denominado por A, B e C alojava uma linhagem diferente e receberam dieta com água e ração à vontade e 2 Kg de seus respectivos adsorventes, a base de bentonita (A), leveduras (B) e aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado (C) por tonelada de ração.

**Tabela 2.** Delineamento experimental

<b>Linhagens</b>	<b>Nº de Aves</b>	<b>Idades (semanas)</b>	<b>Adsorventes (principal ativo)</b>
Dekalb (A)	50	32-68	Bentonita (a)
Bovans (B)	50	32-68	Levedura (b)
Lohmann (C)	50	32-68	Aluminosilicato (c)

As dietas foram elaboradas baseadas nas recomendações para a linhagem e os ingredientes tiveram valorização nutricional segundo Rostagno et al. (2011), a formulação da ração esta descrita no Quadro 2.

**Tabela 3.** Formulação de dieta base para as rações de poedeiras entre 32 a 68 semanas.

<b>Ingredientes e níveis nutricionais</b>		<b>Pico</b>
<b>Macro Ingredientes</b>		
Milho	%	201,000
Milheto	%	500,000
Farelo de soja	%	162,000
Farinha de carne	%	29,000
Calcário grosso	%	32,000
Calcário fino	%	71,000
Sal	%	1,800
<b>Níveis Nutricionais</b>		
Proteína	%	17,00
Gordura	%	3,32
Fibra bruta	%	2,63
Cálcio	%	4,15
Fosforo	%	0,42
Energia metabolizável	Kcal/kg	2.830,00

#### 4.3 ANÁLISE DAS RAÇÕES QUANTO A PRESENÇA DE MICOTOXINAS

Considerando o período de coleta entre 32 e 68 semanas de idade das aves, a cada quatro semanas foram coletadas amostras de ração dos comedouros de forma aleatória, em diversos pontos totalizando 5 Kg. Posteriormente as amostras foram levadas ao laboratório da própria granja para detectar a presença de micotoxinas por imunocromatografia de fluxo lateral utilizando o Kit Reveal® Q+ aflatoxin, Kit Reveal® Q+ T-2 e Kit Reveal® Q+ fumonisin, seguindo as recomendações do fabricante com a leitura dos resultados realizada pelo Accuscan® Pro.

Para a análise de aflatoxinas e fumonisinas foram utilizados 10g de cada amostra extraídos com 50ml de álcool etílico 65%. A amostra foi agitada neste meio por 3 minutos vigorosamente e, em seguida, filtrados. Foram adicionados 500 $\mu$ L do diluente ao tubo de diluição e coletado 100 $\mu$ L do filtrado, adicionando ao tubo de diluição. Em seguida foi transferido 100 $\mu$ L do tudo de diluição para novo tubo e colocou a fita do teste Reveal® Q+ Aflatoxin, aguardando seis minutos para leitura dos resultados. Para análise dos Tricotecenos, a única diferença foi a utilização da água destilada para extração ao invés do álcool e o volume do diluente, que neste caso foram 200 $\mu$ L. As demais etapas foram semelhantes à utilizada para aflatoxina e fumonisina, realizando a leitura ao final do processo.

#### 4.4 COLETA DE AMOSTRAS

No período entre 32 e 68 semanas de idade, a cada quatro semanas, cinco aves por lote foram avaliadas e, em seguida, realizada a coleta na veia ulnar de 3mL de sangue, estes foram acondicionados em tubos estéreis sem anticoagulante e deixados em repouso a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 1.600 g, durante 15 minutos para obtenção do soro e então, estes foram armazenados em microtubos de 1,5mL a -20°C até a realização das análises bioquímicas.

Após esse procedimento, para a realização das necropsias, as aves foram eutanasiadas por deslocamento cervical, sendo em seguida fotografado o fígado e rins e as lesões macroscópicas observadas foram registradas em fichas. Para a análise histopatológica, fragmentos desses órgãos foram coletados e acondicionados em frascos contendo formaldeído a 10% tamponado (PBS 0,01M e pH 7,2).

#### 4.5 ANÁLISE DA BIOQUÍMICA SÉRICA

As amostras de soro previamente obtidas em cada coleta foram analisadas quanto a função renal e hepática utilizando-se analisador bioquímico semiautomático (Prietest Touch®) e as determinações das atividades séricas foram realizadas mediante espectrofotometria utilizando-se kits comerciais Labtest®. Todas as reações bioquímicas foram processadas conforme orientação dos fabricantes para as análises de ureia, creatina quinase (CK), ácido úrico, colesterol, albumina, proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).

#### 4.6 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Seguindo o protocolo de rotina do Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE (DMFA-UFRPE), os fragmentos de fígado e rim foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Em seguida os blocos foram cortados em 3µm de espessura em micrótomo rotativo, modelo RM2125RT da Leica® e então foram corados pela hematoxilina e eosina e analisados no microscópio trinocular Leica® DM500 e fotografadas pelo analisador de imagem Leica ICC 50 HD.

Para a avaliação histopatológica foi adotado o protocolo de Sesti et al. (2003) com adaptações, onde as lesões foram analisadas quanto o grau de intensidade e distribuição da natureza do processo necrótico, degenerativo e inflamatório, conforme apresentado no quadro 2.

**Quadro 4.** Escore de lesão para avaliação histopatológica de acordo com o grau de intensidade e distribuição.

Categoria	Escore	Significado
Intensidade	0	Ausente
	1	Discreta
	2	Moderada
	3	Acentuada
Distribuição	0	Ausente
	1	Focal
	2	Focalmente extensa
	3	Multifocal
	4	Multifocal a coalescente
	5	Difusa

Fonte: Sesti et al. (2003), com adaptações.

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados obtidos pela avaliação histopatológica e dosagens bioquímicas foi analisada utilizando o teste não paramétrico, por teste de Kruskal-Wallis e Turkey, adotando-se nível de significância de 5% e utilizando GraphPad Prism 7,0. Todos os resultados foram compilados e organizados em tabelas para elaboração das frequências relativas, distribuição e intensidade das lesões histopatológicas e bioquímicas séricas. Através da análise estatística foi possível determinar quais lesões foram mais frequentes,

quais grupos obtiveram mais lesões e a significância das alterações com ou sem diferença estatística.

## 5 REFERÊNCIAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Regulamento técnico mercosul sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, amendoim e milho (revogação da res. gmcn°56/94).

ALIM, M.; IQBAL, S. Z.; MEHMOOD, Z.; ASI, M. R.; ZIKAR, H.; CHANDA, H. & MALIK, N. Survey of mycotoxins in retail market cereals, derived products and evaluation of their dietary intake. *Food Control*, v. 84, p. 471-477, 2018.

ASTOLFI, P.; REYNOSO, M. M.; RAMIREZ, M. L.; CHULZE, S. N.; ALVES, T. C. A. & TESSMANN, D. J. Genetic population structure and trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum* isolated from wheat in southern Brazil. *Plant Pathology*, v. 61, p. 289-295, 2012.

ABDOLLAHI, M. R.; RAVINDRAN, V.; WESTER, T. J.; RAVINDRAN, G. & THOMAS, D. V. Influence of conditioning temperature on the performance, nutrient utilization and digestive tract development of broilers fed on maize- and wheat-based diets. *Poultry Science*, v. 51, p. 648-657, 2010.

BACHA, W. J.; BACHA, L. M. *Color Atlas of Veterinary Histology*. Baltimore: Lippincott. ed. 2. p. 163-174, 2000.

BELUSSO, D. & HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. *Revista Percurso*, v. 2, p. 25-51, 2010.

BERTHILLER, F.; SULYOK, M.; KRŠKA, R. & SCHUHMACHER, R. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International journal of food microbiology*, v. 119, p. 33-37, 2007.

BORSA, A.; KOHAYAGAWA, A.; BORETTI, L. P.; SAITO, M. E.; KUIBIDA, B. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.4, p. 675-677, 2006.

BRYDEN, W. L. Mycotoxin contamination of the feed supply chain: implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, v. 173, p. 134-158, 2012.

BÜNZEN, S.; HAESE, D. BÜZEN S.; HAESE D. Controle de micotoxinas na alimentação de aves e suínos. *Revista Eletrônica Nutritime*, artigo 30, v.3, nº 1, p.299-304p.304-309, janeiro/fevereiro. 2006.

BULLERMAN, L.B. Mycotoxins and food safety. *Food Technol.* v.40,p. 59 – 66, 1986.

CARNEIRO, H. Metodologias para otimizar a variabilidade genética de núcleos de conservação de raças localmente adaptadas. 2012. 125f. Tese de doutorado em Ciências Animais – Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

CANDIDO, M. V. Hematologia, bioquímica sérica e nutrição em aves: Cracidae. 2008. 38 f. Dissertação (Mestrado em Ciências veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

COLVERO, L. P. Micotoxicose em aves. Revisão de literatura. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Campo Grande, 2008.

CORMACK, DH. Fundamentos de Histologia. 2ª edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 380 p, 2003.

DAWSON, K.A.; EVANS, J. & KUDUPOJE, M. Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding. 1 ed. United Kingdom: Nottingham University Press, 2001.

DEMÉTRIO, C. S.; FORNASIERI, D. F.; CAZETTA, J. O. & CAZETTA, D. A. Desempenho de híbridos de milho submetidos a diferentes espaçamentos e densidades populacionais. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 43, p. 1691-1697, 2008.

DEVEGOWDA, G. & MURTHY, T.N.K. Mycotoxins: their effects in poultry and some practical solutions. 1 ed. United Kingdom: Nottingham University Press, 2005.

DEVEGOWDA, G., RAJU, M.V.L.N. & SWAMY, H.V.L.N. Mycotoxins: Novel solutions for their counteraction. Feedstuffs, v. 1, p.12-15, 1998.

DIAZ, G. J.; VARGAS, M. L. & CORTÉS, A. 2016. Evaluation of the supplementation of a feed additive as a potential protector against the adverse effects of 2.5 ppm T-2 toxin on growing broiler chickens. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 68, p.709-715, 2016.

DIAZ, D.E.; HAGLER JUNIOR, W.M.; HOPKINS, B.A. ET AL. Aflatoxin binders I: in vitro binding assay for aflatoxin B1 by several potential sequestering agents. Mycopathologia, v.156, n. 2, p. 223-226, 2002.

FAUSTO, N., CAMPBELL, JS. & RIEHLE, K. J. Liver regeneration. Hepatology. Baltimore, Md., vol. 43, n 1. p. 45-53, 2006.

FUMAGALI, M.; FIORINI, I. V. A.; MACHADO, R. A. F.; PEREIRA, H.D.; PEREIRA, C. S.; PIRES, L. P. M. & RESENDE, F. R. Maize productivity performance of simple hybrid in function of throw spacing and plant populations. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 16, p. 426-439, 2017.

FUJII,S.;GARCIA,L. ;HIROOKA,E. Metodologia analítica imunoquímica com ênfase na detecção de micotoxinas – ficotoxinas no sistema agroalimentar. Alim. Nutr., Araraquara, v. 15, n. 3, p. 273-284, 2004.

FURLAN, R.L. MACARI, M.; MORAES, V. M. B. et al. Alterações hematológicas e gasométricas em diferentes linhagens de frangos de corte submetidos ao estresse calórico agudo. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.1, n.1, p. 77-84, 1999.

GOMES, A. R.; MARCOLONGO, P. C.; SALLIS, E. S. V.; PEREIRA, D. I. B.; SCHILD, A. L.; FARIA, R. O. & MEIRELES, M. C. A. Aflatoxicose em cães na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 34, p. 162-166, 2014.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. *Introdução a bioquímica clínica veterinária*. 2 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS. p.364, 2006.

GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; TOMÉ, P. H. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; ASCHERI, J. L. R. & ABREU, C. M. P. Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grits. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, p. 643-650, 2003.

GOLDSTEIN, D. L.; SKADHAUGE, E. Renal and external regulation of body fluid composition. San Diego. p. 265-297, 2000.

HERMANN, G.; PINTO, F. T. & KITAZAWA, S. E. Fungos e fumonisinas no período pré-colheita do milho. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, p. 7-10, 2006

HUFF, W. E.; KUBENA, L. F.; HARVEY, R. B., & PHILLIPS, T. D. Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the individual and combined toxicity of aflatoxin and ochratoxin A. *Poultry Science*, v. 71, p. 64-69, 1992.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Quantidade de ovos de galinha produzidos e de efetivos, e variação, segundo os meses - Brasil - 2017 – 2018. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9216-pesquisa-trimestral-da-producao-de-ovos-de-galinha.html?edicao=21442&t=resultados> .Acesso em: 3 dez. 2018.

IARC, I.A.f.R.O.C. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. v.10, p. 51 – 52, 1976.

JAY, James. M. *Micotoxinas*. In. *Microbiologia de alimentos*. 6º Ed, Porto Alegre: Artmed, p.711, 2005.

JOBIM, C. C.; GONÇALVES, G. D. & SANTOS, G.T . Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: **SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS**, 458 XXXII Congresso Nacional de Milho e Sorgo “Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil”1., 2001, Maringá. Anais... Maringá: Universidade Estadual de Maringá, p. 242-261, 2001.

JUNQUERIA LC, CARNEIRO J. *Histologia Básica*, 12ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 556 p, 2013.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W. & BRUSS, M. L. *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press, 2008.

KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defence strategy against antagonistic animals. *Revista.Fungal Ecology*, v. 3, n. 3, p. 107-114, 2010.

KOSICKI, R.; BLAJET-KOSICKA, A., GRAJEWSKI, J. & TWARUZEK, M. Multiannual mycotoxin survey in feed materials and feedingstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, v. 215, p.165-180, 2016.

KURTZMAN, C. P.; HORN, B. W. & HESSELTINE, C. W. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 53, p. 147-158, 1987.

LEESON, S.; DIAZ, G. & SUMMERS, J.D. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. 1ed. Ontario: University Books, 1995.

MARTINS, C.; ASSUNÇÃO, R.; CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. F.; JAGER, A.; PETTA, T.; OLIVEIRA, C. A. & ALVITO, P. Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. *Food Chemistry*, v. 239, p. 132-140, 2018.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G., & SANCHIS, V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 60, p. 218-237, 2013.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: *Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola*, Santos SP. Anais. Santos, Apinco, p. 213-224. 2006.

McLELLAND, J. *A colour atlas of avian anatomy*. Aylesbury. Wolfe Publishing, p. 66- 84, 1990.

MEDINA, A.; RODRIGUEZ, A.; SULTAN, Y. & MAGAN, N. Climate change factors and *Aspergillus flavus*: effects on gene expression, growth and aflatoxin production. *World Mycotoxin Journal*, v. 8, p.171-179, 2015.

MURUGESAN, G. R.; LEDOUX, D. R.; NAEHRER, K.; BERTHILLER, F.; APPLGATE, T. J.; GRENIER, B. & SCHATZMAYR, G. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poultry Science*, v. 94, p. 1298-1315, 2015.

NEWMAN, S. J.; CONFER, A. W.; PANCIERA, R. J. Sistema urinário. In: McGAVIN, M. D.; ZACHARY, J. F. *Bases de Patologia em Veterinária*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 613-691, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica Lehninger*. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1274, 2011.

OLDENBURG, E.; HÖPPNER, F.; ELLNER, F. & WEINERT, J. *Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed*. *Mycotoxin Research*, v. 33, p. 167-182, 2017.

OLVER, M.D. Effect of feeding clinoptilolite (zeolite) on the performance of three strains of laying hens. *British Poultry Science*, v. 38, n. 4, p. 220-222, 1997.

OSBORNE, D.J. & HAMILTON, P.B. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. *Poultry Science*, v. 60, p.1818-22, 1981.

OUESLATI, S.; BERRADA, H.; MANES, J. & JUAN, C. Presence of mycotoxins in Tunisian infant foods samples and subsequent risk assessment. *Food Control*, v. 84, p. 362-369, 2018.

OSUNA, O. Control de las micotoxicosis en el campo avícola. 1ed. México: ANECA, 1989.

PINOTTI, L.; OTTOBONI, M.; GIROMKINI, C.; DELL'ORTO, V. & CHELI, F. 2016. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins*, v. 8, p.45, 2016.

POUTON, C. W.; HAYNES, J. M. Pharmaceutical application of embryonic stem cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.57, p.1918-1934, 2005.

PROGRAM, N.T. Aflatoxins. In Report on Carcinogens. v.12, 2011.

REIS, J. S.; XAVIER, E. G.; ROSSI, P.; LOPES, D. C. N.; DIONELLO, N. J. L. & RUTZ, F. Efeitos dos tricotecenos na avicultura e métodos de controle. *Pubvet*, v.6, p.1399-1404, 2012.

REDDY A.R.; REDDY, V.R.; RAO, P.V. & YADAGRI B. Effect of experimentally induced aflatoxicosis on the performance of commercial broiler chickens. *Indian Journal of Animal Sciences*, v.52, p.405-410, 1982.

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I.; DONZELE, J. L.; SAKOMURA, N. K.; PERAZZO, F. G. & BRITO, C. O. Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais. 4 ed. Viçosa: Departamento de Zootecnia – UFV, 2017

ROSS, M. H.; PAWLINA, W. Histologia: Texto e atlas em correlação com a biologia celular e molecular. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana S.A.C.F, 5 ed. p. 651-687, 2008.

RUIZ, M. J.; MACÁKOVÁ, P.; GARCÍA, A. J. & FONT, G. Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. *Food and Chemical Toxicology*, v.49, p.2718-2724, 2011.

SANTURIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, Campinas, v.2, n. 1, p. 1-12, 2000.

SCHIMIDT, E. M. S.; LOCATELLI-DITTRICH, R.; SANTIN, E. et al. Patologia clínica em aves de produção – uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. *Archives of Veterinary Science*, v.12, n. 3, p. 9-20, 2007.

SESTI, L., KNEIPP, C., PARANHOS, R., PAULET, P. & CAZABAN, C. Field safety and efficacy of a vector Marek's/Newcastle disease vaccine (rHVT – NDV) as assessed by clinical and productive performance in a large population of commercial broilers. In Proceedings of 62nd Western Poultry Disease Conference. Sacramento, v.1, p. 19-22, 2013.

SIBBALD, I. R. The effects of dietary cellulose and sand on the combined metabolic plus endogenous energy and amino acid outputs of adult cockerels. Poultry Science, v.59, p.836-844, 1980.

SISK, D.B. & CARLTON, W.W. Effect of dietary protein concentration on response of miniature swine to aflatoxins. American Journal Veterinary Research, v.33, p.107-114, 1972.

SIMAS, M. M.; BOTURA, M. B.; CORREA, B.; SABINO, M.; MALLMANN, C. A.; BITENCOURT, T. C. & BATATINHA, M. J. Determination of fungal microbiota and mycotoxins in brewers grain used in dairy cattle feeding in the State of Bahia, Brazil. Food Control, v.18, p.404-408, 2007.

SCHAEFFER, J.L. & HAMILTON, P.B. Interactions of mycotoxins with feed ingredients. Do safe levels exist? In: Smith, J.E. & Henderson, I. ed. Boca Raton: Mycotoxins and Animal Foods, 1991.

SOBRINHO, W. N.; SANTOS, R. V.; JÚNIOR, J. C. M., & SOUTO, J. S. Acúmulo de nutrientes nas plantas de milho em função da adubação orgânica e mineral. Revista Caatinga, v.22, p.3, 2009.

SOUZA, A. E. Brazilian Corn Exports: An Analysis of Cargo Flow in Santos and Paranaguá Port. IFIP ADVANCES IN INFORMATION AND COMMUNICATION TECHNOLOGY, 2017.

STRINGHINI, J. H.; RIBEIRO, A. M. L.; PONTALTI, G. C. & MCMANUS, C. M. Quality assessment of corn batches received at a feed mill in the Brazilian cerrado. Revista Brasileira de Ciência Avícola, v.16, p.233-240, 2014.

SWAMY, H.V.L.N. Mycotoxicoses in poultry: an overview from the Asia-Pacific region. In: Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 21th Annual Symposium (T. P. Lyons, K. A. Jacques, J. M. Hower, eds), Nottingham University Press, UK. p. 75-89. 2005.

TAHIR, M.; SHIM, M.; WARD, N. E.; SMITH, C.; FOSTER, E.; GUNAY, A. C. & PESTI, G. M. Phytase and other nutrients components of feed ingredients for poultry. Poultry Science, v.91, p.928-935, 2012.

TERRA, C. Ovo, a proteína do 3º milênio. Congresso de produção e consumo de ovos. v.1, p. 8-9, 1999.

TESSARI, E.N.C.; OLIVEIRA, C.A.F.; CARDOSO, A.L.S.P.; LEDOUX, D.R. & ROTTINGHAUS, G.E. Efeitos da aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre os níveis séricos de aspartato amino-transferase e proteína total de frangos de corte. Instituto Biológico de São Paulo, v.72, p.185-189, 2005.

TONIN, J. M.; BRAGA, M. J. & COELHO, A. B. Efetividade de hedge do milho com contratos futuros da BM&F: uma aplicação para a região de Maringá. *Revista de Economia*, v.35, p.115-140, 2009.

TRAESEL, C. K. Perfil bioquímico sérico de frangos de corte alimentados com dieta suplementada com óleos essenciais de pimenta. 56 f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária). Universidade Federal de Santa Maria, 2009.

UBIALI, D. G.; BOABAID, F. M.; BORGES, N. A.; CALDEIRA, F. H.; LODI, L. R.; PESCADOR, C. A. & COLODEL, E. M. Intoxicação aguda com sementes de *Crotalaria spectabilis* (Leg. Papilionoideae) em suínos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.31, p.313-318, 2011.

WANG, E.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; RILEY, R.T. & MERRIL, A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *Journal of Biological Chemistry*, v.266, p.14486-90, 1991.

WEIBKING, T.S.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; TURK, J.R. & ROTTINGHAUS, G.E. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisin B1, on the young broiler chick. *Poultry Science*, v.72, p.456-66, 1993.

WIELOGÓRSKA, E.; MACDONALD, S. & ELLIOT C. T. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. *World Mycotoxin Journal*, v. 9, p. 419-433, 2016.

WILLIAM, J.H., PHILIPS, T.D., JOLLY, P.E., STILES, J.K., JOLLY, C.M., AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*. V.80, p.1106-22, 2004.

ZAACHARIASOVA, M.; DZUMAN, Z.; VEPRIKOVA, Z.; HAJKOVA, K.; JIRU, M.; VACLAVIKOVA, M. & HAJLSLOVA, J. Occurrence of multiple mycotoxins in European feedingstuffs, assessment of dietary intake by farm animals. *Animal Feed Science and Technology*, v. 193, p.124-140, 2011.

ZORN, A.M.. *The StemCellResearchCommunity. Liverdevelopment: stemBook Cambridge*: 2008.

## 6. ARTIGO

6.1 (Artigo científico formatado Segundo normas da revista “Tropical Animal Health and Production”)

**Poedeiras comerciais alimentadas a longo prazo com dietas contendo subdoses de multomicotoxinas podem apresentar lesão renal e hepática?**

Thaiza Campelo Braga<sup>1\*</sup>, Priscila Maria Cavalcanti Rocha<sup>1</sup>, Maria Edna Gomes Barros<sup>1</sup>, Francisco de Assis

Leite Souza<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal , Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom Manoel de Medeiros , s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

\*Corresponding author: [thaizaveterinaria@hotmail.com](mailto:thaizaveterinaria@hotmail.com)

**Poedeiras comerciais alimentadas a longo prazo com dietas contendo subdoses de multimicotoxinas  
podem apresentar lesão renal e hepática?**

Thaiza Campelo Braga<sup>1\*</sup>, Priscila Maria Cavalcanti Rocha<sup>1</sup>, Maria Edna Gomes Barros<sup>1</sup>, Francisco de Assis  
Leite Souza<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal , Universidade Federal Rural de Pernambuco, Avenida Dom  
Manoel de Medeiros , s/n, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

\*Corresponding author: thaizaveterinaria@hotmail.com

**Abstract** - Mycotoxins are caused by the metabolic stress of fungi, resulting from the storage of the grain and the harvesting process. Thus, these metabolites may be present, therefore, in diets used for animal feed in the production system. This study aimed to evaluate the cumulative and synergistic effect of mycotoxins present in diets fed to laying hens at different peak production ages. Fifty commercial laying hens of the Dekalb strain at peak production periods between 32 and 68 weeks were evaluated using serological samples, kidney, liver and feed samples to detect and quantify the presence of aflatoxin, fumonisin and T-2 toxin by means of of serum biochemistry tests. , histopathology and lateral flow immunochromatography, respectively. In the analysis of mycotoxins in the diets, the presence of underdoses of aflatoxins, fumonisins and trichothecenes was confirmed. Histopathological examinations showed lesions suggestive of mycotoxicosis, such as proliferative and membranoproliferative glomerulopathy, tubular necrosis, nephritis and nephrosis, hepatic steatosis, hepatitis, hepatocyte necrosis, bile duct proliferation, hypertrophy and Kupfer cell microgranuloma. In the results of the serum biochemistry, the values of uric acid, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were normal. The results of tests for urea, creatinine, cholesterol, total proteins, creatinine and albumin were presented. Thus, we can suggest that there is a progressive and cumulative effect of kidney and liver damage, directly correlated with the time of exposure and chronic ingestion of multimycotoxins.

**Keywords:** synergistic effect, dekalb, immunochromatography, multimycotoxins

## Introdução

Os fungos através do processo de esporulação produzem vários metabólitos secundários que são associados à indução de efeitos tóxicos quando ingeridos por animais e humanos, como é o caso das micotoxinas (D'mello, 1997). O consumo de rações contendo micotoxinas acarretam em maior susceptibilidade ao desenvolvimento de imunossupressão, pois a presença dos agentes tóxicos são capazes de interferir nos processos enzimáticos dos nutrientes provocando diminuição do valor nutricional nos grãos, principalmente nos níveis de energia (Bünzen e Haese, 2006). Os impactos provocados por micotoxinas na cadeia produtiva acarretam a baixa rentabilidade da produção dos animais em razão da menor qualidade e produtividade da matéria prima e maior conversão alimentar, sobretudo, o aumento dos custos para o produtor com tratamentos e profilaxias na tentativa de reversão dos quadros clínicos tóxicos (Berthiller, 2007).

As aflatoxinas (AFL) fazem parte de um grupo de metabólitos secundários produzidos pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (Kurtzman, 1987). Essa micotoxina é capaz de afetar o metabolismo dos lipídios de reserva energética das aves, com aparecimento de palidez das aves e esteatose hepática, resultante da diminuição da lipase pancreática e secreção biliar afetando absorção dos lipídeos (Gomes, 2014 e Ruiz, 2011). As biotransformações da aflatoxina B1 são diferentes entre as espécies animais, o que pode corresponder aos diferentes graus de susceptibilidade à aflatoxina B1 entre os indivíduos (Wogan, 1992). Estudos desenvolvidos por Patterson (1983) comprovam que a aflatoxina promove o desenvolvimento de agentes precursores de tumores hepáticos em todas as espécies animais. Estão relacionados em quadros de aflatoxicose alterações principalmente hepáticas, com sinais clínicos de prostração, perda de peso, aves ictericas e alta mortalidade (Leeson, 1995)

As fumonisinas são metabólitos originados de compostos secundários produzidos pelos fungos, *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*. O mecanismo de ação dessas toxinas é verificado pelo bloqueio na síntese dos esfingolipídios, substância importante para a integridade da membrana celular e transporte iônico através das células (Wang, 1991). Estudos realizados sobre o potencial toxicológico das fumonisinas em diferentes espécies permitiram determinar que órgão alvo pudesse ser variável em cada espécie (Voss, 2001). Porém, certos órgãos, incluindo o fígado e o rim, são frequentemente afetados, sendo considerando seu potencial hepatotóxico em todos os animais testados (ratos, camundongos, coelhos, macacos, porcos e cavalos) e nefrotóxico em ratos, coelhos, porcos e camundongos (Voss, 2001). A ação nefrotóxica já foi relatada em mamíferos não ruminantes apresentando alterações na osmolaridade urinária, através

comprometimento ocasionado pela hipertrofia do órgão, e a necrose tubular renal prejudicando a função enzimática e predispondo ao aparecimento de tumores renais (Khoury e Atoui, 2010).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito cumulativo e sinérgico das micotoxinas presentes nas rações durante diferentes idades em pico produtivo, através da avaliação de lesões histopatológicas e bioquímica sanguínea renais e hepáticas de poedeiras comerciais alimentadas a longo prazo com dietas contendo subdoses de multimicotoxinas .

### **Material e métodos**

Este estudo foi conduzido sob os termos e condições da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, aprovado sob o número 069/2019. O estudo foi realizado e acompanhado em situação natural, em uma granja de poedeiras comerciais, localizada na cidade de Orobó, região Agreste de Pernambuco.

Foi utilizado um total de 50 aves, da linhagem Dekalb, clinicamente sadias, criadas em gaiolas com densidade 420 cm<sup>2</sup>/ave e vacinadas contra Doença de Marek, Doença de Gumboro, Doença de Newcastle, Coriza Aviária, Pneumovirose, Bronquite infecciosa, encefalomielite aviária, Micoplasmose e Bouba Aviária. As aves alojadas nos aviários foram acompanhadas durante seu período de pico de produção entre 32 e 68 semanas de idade. A dieta das aves foi composta por adsorvente para micotoxinas base de bentonita com dosagem recomendada por 2kg/tonelada de ração.

Considerando o período de coleta (32 e 68 semanas de idade), a cada quatro semanas foram coletadas amostras de ração dos comedouros de forma aleatória, em diversos pontos totalizando 5 Kg. Posteriormente as amostras foram levadas ao laboratório da própria granja para detectar a presença de micotoxinas por imunocromatografia de fluxo lateral utilizando o Kit Reveal® Q+ aflatoxin, Kit Reveal® Q+ T-2 e Kit Reveal® Q+ fumonisin, seguindo as recomendações do fabricante, sendo a leitura dos resultados realizada pelo Accuscan® Pro.

A cada quatro semanas, cinco aves foram avaliadas e, em seguida, realizada a coleta na veia ulnar de 3mL de sangue, estes foram acondicionados em tubos estéreis sem anticoagulante e deixados em repouso a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 1.600 g, durante 15 minutos para obtenção do soro e então, estes foram armazenados em microtubos de 1,5mL a -20 °C até a realização das análises bioquímicas.

Após esse procedimento, para a realização das necropsias, as aves foram eutanasiadas, sendo em seguida, coletados fragmentos dos rins e acondicionados em frascos contendo formaldeído a 10% tamponado (PBS 0,01M e pH 7, 2). As amostras de soro previamente obtidas em cada coleta foram analisadas quanto a

função renal (ureia, creatina quinase – CK e ácido úrico) e hepática (albumina, alanina aminotransferase-ALT, aspartato aminotransferase- AST, colesterol e proteína total) utilizando-se kits comerciais Labtest® conforme orientação dos fabricantes. Para a leitura dos resultados foi utilizado o analisador bioquímico semiautomático (Prietest Touch®) e as determinações das atividades séricas foram realizadas mediante espectrofotometria.

Nas coletas de todas as idades, os fragmentos dos rins e fígado permaneceram 24 horas no fixador e então foram clivados, sendo em seguida transferidos para solução de álcool a 70% até o início do processamento histológico. Este foi realizado seguindo o protocolo de rotina do Laboratório de Histologia Animal do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE (DMFA-UFRPE), onde os fragmentos de rim foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, impregnados e incluídos em parafina. Em seguida os blocos foram cortados em 3µm de espessura em micrótomo rotativo, modelo RM2125RT da Leica® e então foram corados pela hematoxilina e eosina e analisados no microscópio trinocular Leica® DM500, sendo fotografadas pelo analisador de imagem Leica ICC 50 HD.

A análise estatística dos dados obtidos pela avaliação histopatológica e dosagens bioquímicas foi analisada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Turkey, adotando-se nível de significância de 5%, tendo sido utilizado o software GraphPad Prism v.7.0. Todos os resultados foram compilados e organizados em tabelas para elaboração das frequências relativas das lesões histopatológicas e bioquímicas séricas.

## **Resultados**

A partir da dosagem de micotoxinas nas amostras de rações foi possível verificar que a média das quantidades de aflatoxinas, fumonisinas e tricotecenos permaneceram dentro dos valores permitidos (Tabela1).

De acordo com o Tabela 2, as lesões histopatológicas mais frequentes nas aves consistiram em glomerulopatia membranosa, proliferativa e membranoproliferativa, hiperemia, necrose tubular, nefrite intersticial, nefrose e proteinose tubular. Observou-se que entre as lesões de glomerulopatias, foram frequentes em todas as idades das aves do estudo, sendo a do tipo proliferativa com maior frequência em aves mais jovens, caracterizada por um aumento de celularidade mesangial glomerular com predomínio de distribuição multifocal e de intensidade leve. Ao decorrer da progressão da idade, constatou-se que a glomerulopatia membranoproliferativa caracterizada por deposição de material eosinofílico proteináceo na membrana basal dos tufo capilares e na cápsula de Bowman e aumento de número células mesangiais com predomínio de distribuição focal e de intensidade leve foi a lesão mais frequente.

A hiperemia teve predomínio de distribuição multifocal e intensidade leve, sendo mais frequente nas idades de 32, 36, 40 e 44 semanas.

A necrose tubular foi encontrada em todas as idades, independente do tipo de glomerulopatia encontrada. A necrose se caracterizou pela presença de células de revestimento dos túbulos proximais e ductos coletores com áreas de vacuolização citoplasmática sem delimitação definida e aumento de eosinofilia, sendo observados vários núcleos picnóticos e cariorréticos.

A nefrite foi caracterizada por infiltrados com distribuição peritubular, periglomerular e/ou multifocal de intensidade leve a moderada.

A Nefrose caracterizou-se por degeneração hidrópica tubular com distribuição multifocal e/ou difusa de intensidade leve.

A proteinose foi evidenciada através da presença de material granular eosinofílico associado ao material fibrilar basofílico nos ductos coletores, sendo expressiva nas idades 32, 36, 40, 44 e 48 semanas.

De acordo com a frequência relativa dos fígados das aves (Tabela 3) observa-se que independentemente, da idade, as aves apresentaram esteatose hepática. A esteatose do tipo degeneração gordurosa macro e micro vesicular difusa moderada foi a lesão de maior frequência. Lesões de degeneração vacuolar difusa leve apresentaram maior frequência relativa nas idades mais jovens das aves.

As lesões de hepatite apresentaram frequência relativa em todas as idades. Foi caracterizada por infiltrados linfocitário periportal focalmente extenso moderado e infiltrados linfocitoplasmocitário multifocal acentuados.

Foi observada hipertrofia de células de Kupffer com distribuição multifocal e intensidade leve em todas as idades das aves no estudo. A presença de microgranuloma de células de Kupffer com distribuição multifocal e intensidade leve foi evidenciado nas idades de 32, 44, 52, 56 e 60 semanas.

A necrose de hepatócitos apresentou distribuição focal e intensidade leve com frequência relativa (Tabela 3) nas idades de 36, 48, 52, 56 e 68 semanas.

A proliferação de ductos biliares apresentou distribuição multifocal e intensidade leve com maior frequência relativa à medida que as aves foram ficando mais velhas.

Quanto aos metabólitos dosados por meio da bioquímica sérica (Tabela 4), as médias dos valores de ácido úrico, ALT e AST permaneceram dentro do intervalo de referência. Já as médias dos valores detectados para ureia, creatinina, colesterol e proteínas totais foram acima dos limites máximos recomendados para poedeiras em todas as idades. Os valores detectados no teste albumina foram abaixo do recomendado.



Esteatose hepática	80	(4/5)	100	(5/5)	40	(2/5)	100	(5/5)	100	(5/5)	100	(5/5)	100	(5/5)	100	(5/5)	100	(5/5)	80	(4/5)
Degeneração vacuolar	20	(1/5)	0	(0/5)	40	(2/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	0	(0/5)
Hepatite	80	(4/5)	40	(2/5)	20	(1/5)	20	(1/5)	60	(3/5)	80	(4/5)	60	(3/5)	40	(2/5)	20	(1/5)	20	(1/5)
Hipertrofia de células de Kupffer	40	(2/5)	20	(1/5)	0	(0/5)	20	(1/5)	20	(1/5)	40	(2/5)	40	(2/5)	20	(1/5)	20	(1/5)	40	(2/5)
Microgranuloma de células de Kupffer	20	(1/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	40	(2/5)	0	(0/5)	100	(5/5)	40	(2/5)	20	(1/5)	0	(0/5)	0	(0/5)
Necrose de hepatócitos	0	(0/5)	20	(1/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	40	(2/5)	40	(2/5)	20	(1/5)	0	(0/5)	0	(0/5)	20	(1/5)
Proliferação de ductos biliares	0	(0/5)	20	(1/5)	0	(0/5)	20	(1/5)	40	(2/5)	20	(1/5)	80	(4/5)	40	(2/5)	60	(3/5)	20	(1/5)

Teste de Kruskal-Wallis ao nível de 5% de significância.

**Quadro 4.** Bioquímica sérica dos parâmetros renais e hepáticos em poedeiras comerciais entre 32 e 68 semanas alimentadas com dietas contendo subdoses de micotoxinas

Parâmetros	32 semanas	36 semanas	40 semanas	44 semanas	48 semanas	52 semanas	56 semanas	60 semanas	64 semanas	68 semanas
	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5	n=5
Albumina	1,96	1,60	1,67	1,68	1,43	1,82	2,07	1,94	3,73	1,57
ALT	23,75	51,20	46,63	23,91	29,11	15,07	10,20	7,55	24,15	17,77
AST	186,50	225,52	247,18	222,61	8,71	41,43	193,16	200,27	156,56	159,45
Colesterol	131,22	112,27	143,15	94,35	632,52	582,35	375,27	767,76	166,27	145,43
Proteína Total	6,44	6,21	5,03	5,03	5,69	5,52	5,98	6,17	5,02	5,11
CK	2214,69	2023,83	2492,43	1410,49	1016,28	1507,14	758,34	865,36	1189,38	669,79
Ácido úrico	6,71	6,18	5,69	8,32	3,17	5,33	6,74	6,77	5,55	5,52
Uréia	8,38	5,89	6,64	7,40	10,58	6,70	6,34	6,95	2,98	5,86

## Discussão

No estudo observa-se que o teste realizado nas amostras de rações através da técnica de imunocromatografia de fluxo lateral obteve resultados inferiores aos valores máximos recomendados, podendo atribuir que as aves durante todo estudo consumiram, em condições reais da granja, subdoses de micotoxinas. De acordo com o Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), os níveis máximos de micotoxinas recomendados na alimentação de poedeiras comerciais são de 10, 100 e 1.000 ppb para aflatoxina, tricotecenos e fumonisina, respectivamente.

Observa-se que quanto mais jovens as aves, maior foi a frequência de glomerulopatia proliferativa. À medida que as aves aumentavam a idade, observou-se que a maior frequência foi de glomerulopatia membranoproliferativa, caracterizada por deposição de material eosinofílico proteináceo na membrana basal dos tufo capilares e na cápsula de Bowman (espessamento) e aumento de número células mesangiais. Esses achados estão em conformidade com os encontrados por Valdivia et al. (2001) e Majid et al. (2007), e podem ser compreendidos como resultado progressivo de lesão renal a permanência de ingestão de micotoxinas por poedeiras comerciais.

A presença de infiltrado linfohistioplasmocitário e/ou linfohistiocitário peritubular e periglomerular e células tubulares apresentando núcleos picnóticos, núcleos em cariorexe e em cariólise são achados histopatológicos em quadros de micotoxicose. Achados como nefrite, nefrose e necrose tubular foram evidentes em todas as idades. Segundo Keelly & Moura (1976), e Klaassen et al. (2008), a infiltração linfocitária caracterizada por células inflamatórias de linfócitos, mononucleares e polimorfonucleares podem estar envolvidas em um processo regenerativo de células parenquimatosas ou não parenquimatosas.

Observa-se que as aflatoxinas são responsáveis por alterações no quadro histológico do fígado de diversas espécies animais e que existe uma relação direta entre a quantidade de aflatoxina ingerida e a intensidade de lesão detectada no fígado (Chen, 1984). Neste estudo, observamos que o tempo de exposição ao consumo de micotoxina, ainda que em subdoses, podem sugerir lesões de micotoxicoses. Essas lesões consistiram em degeneração gordurosa macro e microvesicular difusa, além de hipertrofia células de Kupffer e proliferação de ductos biliares, variando em sua distribuição e intensidade. De acordo com Galtier (1998), proliferação de ductos biliares são lesões comumente encontradas em estados crônicos de consumo de micotoxinas.

Segundo Rodrigues et al 1996, sugerem que aves com altos graus de necrose e vacuolização dos hepatócitos podem apresentar essas lesões, ainda que dependentes de doses de micotoxinas, em uma ingestão crônica da mesma. A degeneração vacuolar pode ocorrer em estágios iniciais de sensibilidade hepática as

micotoxinas (Carvalho, 1995). Os processos inflamatórios caracterizados por infiltrados linfocitários e linfohistiocitário são comuns em fígados desafiados por agentes tóxicos.

Mesmo representando condições naturais de uma granja de postura comercial, este estudo mostra que ainda que se identifiquem quantidades de micotoxinas inferiores aos níveis máximos recomendados, a análise histológica sugere o desenvolvimento de lesões renais e hepáticas progressivas o que poderia estar relacionado à ingestão crônica de subdoses das multimicotoxinas detectadas.

Na análise de bioquímica sérica foi avaliado o ácido úrico, pois é sintetizado no fígado e nos rins, onde a excreção é via secreção tubular em 90%, independente da reabsorção tubular de água. Assim, os distúrbios na função renal podem aumentar a concentração do ácido úrico no soro ou no plasma nas aves (Schmidt, 2007). De acordo com Schmidt et al. (2007), valores entre 2 a 7 mg/dL são considerados normais para aves poedeiras. No presente estudo foram obtidos valores dentro deste intervalo, apresentando normalidade. Contudo valores de ácido úrico podem apresentar normalidade mesmo quando há lesão renal. Em nefropatias, por exemplo, a filtração de urina pode estar aumentada compensando assim a diminuição da capacidade secretora (Capitelli e Crosta, 2013).

Já os níveis de ureia encontraram-se superiores a 5 mg/. Esse resultado deve-se ao fato de o teste de ureia ser um excelente indicativo de desidratação. Quando comparado com os resultados de ácido úrico, e este apresenta valores dentro da normalidade, pode-se desconsiderar a possibilidade de falhas renais e comprometimentos na filtração (Capitelli e Crosta, 2013).

Os níveis de creatinina apresentam valores normais de acordo com Hochleither et. al (1994) entre 0,1 e 0,4 mg/dL. No presente estudo, foi encontrado aumento significativo em todas idades. Resultados superiores podem ser encontrados em danos severos renais e musculares, desta forma, acredita-se que este aumento seja ocasionado por manejo estressante em poedeiras (Rajman, 2006).

Na análise de bioquímica sérica (Tabela 4) foi avaliada a atividade das enzimas AST e ALT, onde encontrou-se valores dentro dos recomendados por Schmidt (2007) de 0-100 mg/dL para ALT e de 0-350 mg/dL para AST. O fígado é o órgão alvo nas aflatoxicoses em aves, a inclusão desta micotoxina no alimento causa alterações importantes no metabolismo hepático, afetando a síntese de proteínas, lipídeos e enzimas, podendo também induzir a síndrome do fígado gorduroso. Em pesquisa feita por Fernandez (1994), em galinhas poedeiras com adição de aflatoxina na ração não foi observada alteração nos níveis das enzimas, achado semelhante ao encontrado neste estudo.

Nas aves a maior fração protéica (40-60%) é correspondente a albumina que é sintetizada 100% no fígado, por isso sua medição pode ser uma ajuda complementar no diagnóstico das doenças hepáticas. Os níveis normais variam de 16 a 20 g/L, desta forma as aves do presente estudo apresentaram valores de albumina abaixo, devido a presença de processos inflamatórios, dos recomendados por Schmidt (2007).

Os valores de proteína total nas espécies de aves costumam ser menores quando comparados com os dos mamíferos, geralmente variam de 2,5 a 4,5 g/L (Harr, 2002). No presente estudo, foi observado aumento dos valores de proteína total. Pode justificar-se esse aumento no período de postura devido à constante quantidade de proteína que se pode mobilizar e armazenar na gema e na clara dos ovos; este aumento se deve considerar fisiológico quando se tem normalidade das demais enzimas hepáticas (Burke, 1996).

O colesterol plasmático provém tanto da dieta como da síntese hepática. É eliminado na forma de ácidos biliares e os seus valores normais vão de 100 a 250 g/L. No presente estudo, observa-se que a medida que as aves foram ficando mais velhas, aumentaram os níveis de colesterol. O aumento da concentração pode ocorrer em casos de obstrução biliar extrahepática, fibrose hepática, hiperplasia de condutos biliares, hipotireoidismo, dietas ricas em gorduras, lipemia e inanição (Hochleithner, 1994).

Os níveis de creatinina apresentam valores normais de acordo com Hochleithner, 1994 entre 0,1 e 0,4 mg/dL. No presente estudo, foi encontrado aumentos significativos em todas as idades. Resultados superiores podem ser encontrados em danos severos renais e musculares, desta forma, acredita-se que neste estudo, este aumento seja ocasionado por manejo estressante em poedeiras (Rajman, 2006).

Diante do exposto, poedeiras comerciais alimentadas com subdoses de multomicotoxinas (aflatoxinas, fumonisin e toxina T-2) em fase de pico produtivo apresentaram lesões renais e hepáticas progressivas sugestivas de micotoxicose crônica, embora a função renal e hepática permanecesse dentro da normalidade. Os resultados sugerem que existe efeito progressivo e cumulativo das lesões renais em função da idade das aves, correlacionada diretamente com o tempo de exposição e ingestão de multomicotoxinas.

## **Declarações**

**Financiamento:** Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Este estudo foi parcialmente financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

**Conflito de interesses:** Os autores declaram não haver conflito de interesses.

**Disponibilidade de dados e material:** Não aplicável.

**Disponibilidade do código:** Não aplicável.

**Aprovação Ética:** Este estudo foi realizado em estrita conformidade com a legislação brasileira para pesquisa e experimentação com animais e foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco, localizada em Recife, PE, Brasil (Licença N°069 / 2019).

**Consentimento para participar:** Não aplicável.

**Consentimento para publicação:** Não aplicável.

## Referências

- Berthiller, F., Sulyok, M., Krska, R., Schuhmacher, R., 2007. Chromatographic methods for the simultaneous determination of mycotoxins and their conjugates in cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 119, 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.022>
- Biehl, M.L.B., 1987. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *Journal of Food Protection*, 50, 1058-1073. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-50.12.1058>
- Burke, W.H., 1996. Reprodução das aves. In: Swenson, M.J., Reece, W.O. (Eds.). *Fisiologia dos Animais Domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Büzen, S., Haese, D., 2006. Controle de micotoxinas na alimentação de aves e suínos. *Revista Eletrônica Nutritime*, 3, 1, 304-309. Disponível em: <https://www.nutritime.com.br/site/artigo-030-controle-de-micotoxinas-na-alimentacao-de-aves-e-suinos/>. Acesso em: 11 jan. 2021.
- Campbell, T.W., 1994. Hematology. In: RitchieI, B.W., Harrison, G.J., Harrison, L.R. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth Wingers Publishing, 1, 176-198.

- Capitelli, R., Crosta, L., 2013. Overview of psittacine blood analysis and comparative retrospective study of clinical diagnosis, hematology and blood chemistry in selected psittacine species. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 16, 1, 71–120. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2012.10.002>
- Carvalho, E.C.Q., 1995. Micotoxinas e alimentos: implicações na saúde humana e animal. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, 2, 1, 27-31. <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2015.016>
- Chen, C., Pearson, A.M., Coleman, T.H., Gray, J.I., Pestka, J.J., Aust, S.D., 1984. Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed contaminated diet. *Food and Chemical Toxicology*, 22, 6, 447-451. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(84\)90327-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(84)90327-2)
- Chiavaro, E., Cacchioli, C., Berni, E., Spooti, E., 2005. Immunoaffinity clean-up and direct fluorescence measurement of aflatoxins B1 and M1 in pig liver: Comparison with high-performance liquid chromatography determination. *Food Additives and Contaminants*, 22, 11, 1154-1161. <https://doi.org/10.1080/02652030500307115>.
- Cruz, L.C.H., 1995. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses. In: *Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicose em aves*. APINCO, 1-13.
- Dawson, K.A., Evans, J., Kudupoje, M., 2001. *Understanding the adsorption characteristics of yeast cell wall preparations associated with mycotoxin binding*. 1. ed. United Kingdom.
- D’Mello, J.P.F., Macdonald, A.M.C., 1997. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 69, 1-3, 155-166. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(97\)81630-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(97)81630-6)
- Galtier, P., 1998. Biological fate of mycotoxins in animals. *Revue Medicine Veterinaire*, 146, 6, 549-554.
- Gomes, A.R., Marcolongo, P.C., Sallis, E.S.V., Pereira, D.I.B., Schild, A.L., Faria, R.O., Meireles, M.C.A., 2014. Aflatoxicose em cães na região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34, 162-166. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2014000200011>
- Harr, K.E., 2002. Clinical chemistry of companion avian species: a review. *Veterinary Clinical Pathology*, 31, 3, 140–151. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2002.tb00295.x>
- Hochleithner, M., 1994. *Avian medicine: principles and application*. Lake Worth: Wingers Publishing.

- Howarth Jr., B., Wyatt, R.D., 1976. Effect of dietary aflatoxin on fertility, hatchability, and progeny performance of broiler breeder hens. *Applied and Environmental Microbiology*, 31, 5, 680-684. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC291175/pdf/aem00245-0070.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2021.
- Hsieh, D.P., Atkinson, D.N., 1991. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. In: Witmer C.M., Snyder R.R., Jollow, D.J., Kalf, G.F., Kocsis, J.J., Sipes, I.G. (Eds.). *Biological Reactive Intermediates IV. Advances in Experimental Medicine and Biology*, 283, 525-532. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5877-0\\_69](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-5877-0_69)
- Jobim, C.C., Gonçalves, G.D., Santos, G.T., 2001. Qualidade sanitária de grãos e de forragens conservadas “versus” desempenho animal e qualidade de seus produtos. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo “Soluções integradas para os sistemas de produção de milho e sorgo no Brasil”. *Anais do Simpósio Sobre Produção e Utilização de Forragens Conservadas*. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 458, 242-261. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/desempenho.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2021.
- Kelley, V.C., Mora, E.C., 1976. Ultrastructural changes induced by chronic aflatoxicosis in chickens. *Poultry Science*, 55, 317-324. <https://doi.org/10.3382/ps.0550317>
- Klaassen, C.D., 2008. *Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons*. Kansas City, USA.
- Kurtzman, C.P., Horn, B.W., Hesseltine, C.W., 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53, 147-158. <https://doi.org/10.1007/BF00393843>
- Leeson, S., Diaz, G., Summers, J.D., 1995. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. 1. ed. Ontario: University Books.
- Patterson D.S.P., 1983. Aflatoxicosis in farm animals. *Veterinary Research Communications*, 7, 135-140. <https://doi.org/10.1007/BF02228608>
- Rajman, M., Juráni, M., Lamosova, D., Macajova, M., Sedlackova, M., Kostal, L., Jezova, D., Vyboh, P., 2006. The effects of feed restriction on plasma biochemistry in growing meat type chickens (*Gallus gallus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 145, 3, 363-371. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.07.004>

- Reddy, A.R., Reddy, V.R., Rao, P.V., Yadagri, B., 1982. Effect of experimentally induced aflatoxicosis on the performance of commercial broiler chickens. *Indian Journal of Animal Sciences*, 52, 6, 405-410.
- Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, L., Collins, T., 2006. *Manual de patología estructural y funcional*. Madrid, Espanha: McGraw-Hill Interamericana.
- Salle, C.T.P., Rodrigues, O., Bavaresco, A., Lorenzini, G., Moraes, H.L.S., Silva, A.B., Salle, F.O., Nascimento, V.P., Fallavena, L.C.B., 2002. Detecção de aflatoxina B<sub>1</sub> no organismo de frangos de corte através do emprego de ensaio imuno-enzimático utilizando anticorpos monoclonais (ELISA). *Acta Scientiae Veterinariae*, 30, 1, 27-30. <https://doi.org/10.22456/1679-9216.17180>
- Schmidt, E., Locatelli-Dittrich, R., Santin, E., Paulillo, A., 2007. Patologia clínica em aves de produção – Uma ferramenta para monitorar a sanidade avícola – revisão. *Archives of Veterinary Science*, 12, 3, 9-20. <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v12i3.10906>
- Valdiva, A.G., Martinez, F.J., Damian, T., Yamamoto, F., Jaramildo, M.G., Loarca-pina, J., Reyes, L., 2001. Efficacy of n-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B<sub>1</sub> intoxication in broiler chickens. *Poultry Science*, 80, 6, 727-734. <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.727>
- Voss, K.A., Riley, R.T., Norred, W.P., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Howard, P.C., 2001. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environmental Health Perspectives*, 109, 2, 259-266. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109s2259>
- Wang, K., Shi, Z., Zhang, M., Cheng, D., 2013. Structure of PCNA from *Drosophila melanogaster*. *Acta Crystallographica, Section F, Structural Biology and Crystallization Communications*, 69, 4, 387-392. <https://doi.org/10.1107/S1744309113004971>
- Wogan, G.N., 1992. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Progress in Clinical and Biological Research*, 374, 123-137. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1320271/>. Acesso em: 15 jan. 2021.

## LEGENDA FIGURA

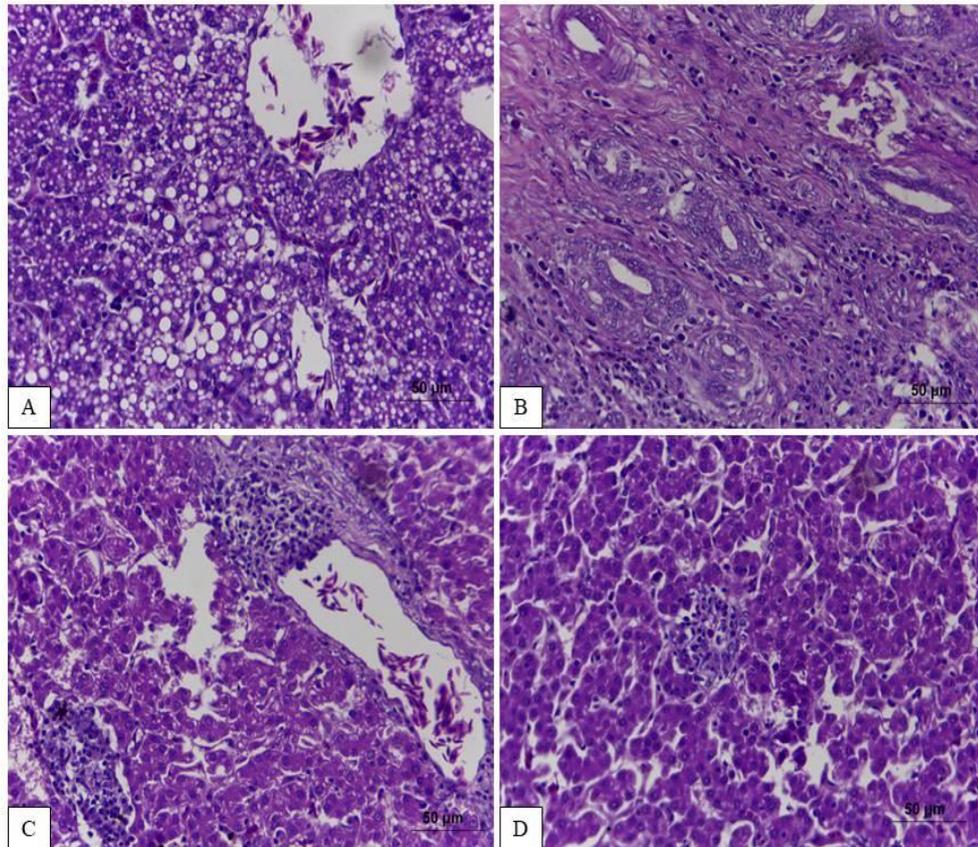


Figura 1. Fotomicrografia do fígado de aves. (A) Degeneração gordurosa, HE, =barra 50 µm; (B) Necrose de hepatócitos, HE, =barra 50 µm; (C) Infiltrado, HE, =barra 50 µm; (D) Microgranuloma de células de Kupfer, HE =barra 50 µm.

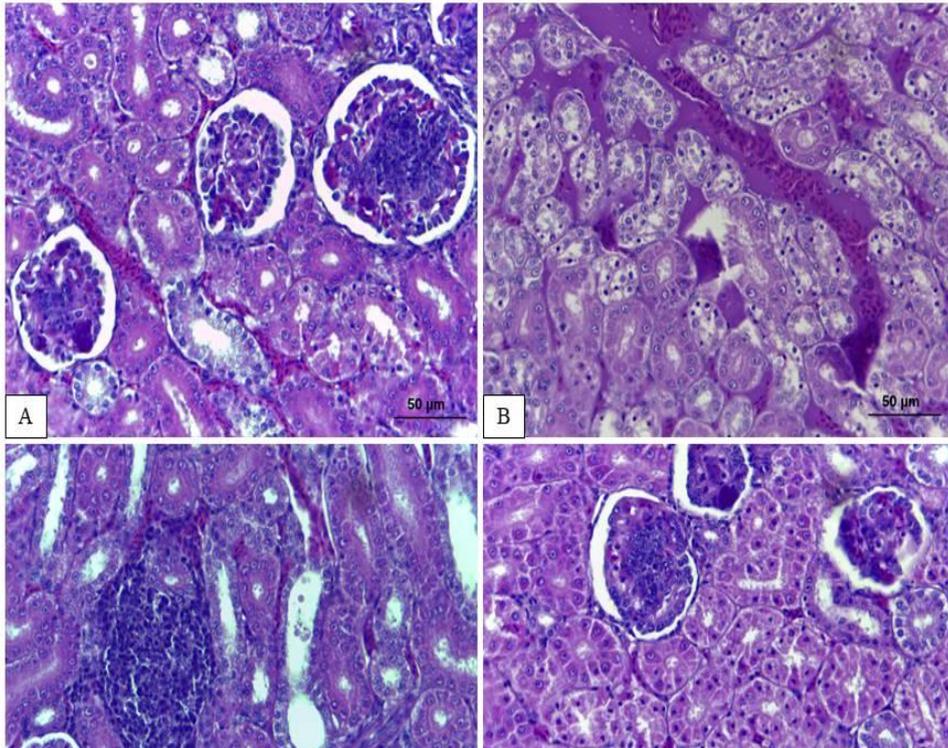


Figura 2. Fotomicrografia do rim de aves. (A) Glomerulonefrite, HE, =barra 50 μm; (B) Necrose tubular, HE, =barra 50 μm; (C) Nefrite, HE, =barra 50 μm; (D) Nefrose, HE =barra 50 μm.

## 7 ANEXOS

## 7.1 LICENÇA DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CEUA - UFRPE  
Aprovado em  
19/06/2019  
Validade  
19/06/2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

**Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA** F-18

**Licença para o uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de**

suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	069/2019
Número do processo	23082.011680/2019-48
Data de emissão da licença	19 de junho de 2019
Título do Projeto	“Micotoxicoses em poedeiras comerciais e seus impactos na produtividade”
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão).	Pesquisa
Responsável pela execução do projeto	Francisco de Assis Leite Souza
Colaboradores	Thaiza Campelo Braga, Joaquim Evêncio Neto, Priscilla Maria Cavalcante Rocha, Maria Edna Gomes de Barros Jéssica de Torres Bandeira, Ana Lessa Oliveira do Nascimento
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Ave fêmea 180. Total: 180

*M. J. Amorim*  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Marleyne Amorim  
Presidente CEUA/UFRPE  
SIAPE 384977

## 7.2 NORMAS DE FORMATAÇÃO DE ARTIGO PARA SUBMISSÃO Á REVISTA TROPICAL ANIMAL HEALTH AND PRODUCTION

### Instructions for Authors

#### Authorship Policy

Authorship should incorporate and should be restricted to those who have contributed substantially to the work in one or more of the following categories:

- Conceived of or designed study
  
- Performed research
  
- Analyzed data
  
- Contributed new methods or models
  
- Wrote the paper

It is the responsibility of the corresponding authors that the names, addresses and affiliations of all authors are correct and in the right order, that institutional approvals have been obtained and that all authors have seen and agreed to a submission. This includes single authorship papers where appropriate. If at all in doubt please double check with eg. Supervisors, line managers department heads etc.

Back to top

#### Types of articles

Manuscripts should be presented preferably in Times New Roman font, double spaced, using A4 paper size. Please use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document and number the lines in a single continuous sequence.

Regular Articles: Articles should be as concise as possible and should not normally exceed approximately 4000 words or about 8 pages of the journal including illustrations and tables. Articles should be structured into the following sections;

(a) Abstract of 150-250 words giving a synopsis of the findings presented and the conclusions reached. The Abstract should be presented as a single continuous paragraph without subdivisions.

(b) Introduction stating purpose of the work

(c) Materials and Methods

(d) Results

(e) Discussion (conclusions should be incorporated in the discussion!)

(f) Acknowledgements

(g) Statement of Animal Rights

(h) Conflict of Interest Statement

(i) References

**Short Communications and Technical Notes:** Short Communications and Technical Notes should not normally exceed approximately 2000 words or about 4 pages of the journal, including illustrations, tables and references. An abstract of 150-250 words should be included and a minimum number of sub-headings may be included if it adds clarity to the article.

Short Communications report original scientific data.

Technical Notes describe innovative methodologies.

**Reviews:** Review articles will be welcomed. However, authors considering the submission of review articles are advised to consult the Editor-in-Chief in advance.

**Correspondence:** Letters on topics relevant to the aims of the Journal will be considered for publication by the Editor-in-Chief who may modify them.

It is the authors responsibility to ensure that submitted manuscripts comply with journal format as indicated in the current instructions to authors and free sample articles on the [springer.com](http://springer.com) journal homepage.

Back to top

Ethical standards

Manuscripts submitted for publication must contain a statement to the effect that all human and animal studies have been approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments.

It should also be stated clearly in the text that all persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study. Details that might disclose the identity of the subjects under study should be omitted.

These statements should be added in a separate section before the reference list. If these statements are not applicable, authors should state: The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

The editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned requirements. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned requirements

Back to top

#### Manuscript Submission

#### Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit manuscript” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Please ensure you provide all relevant editable source files. Failing to submit these source files might cause unnecessary delays in the review and production process.

#### Costs of Color Illustrations

Online publication of color illustrations is always free of charge.

For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs of EUR 950 / US\$ 1150 (+ local tax) per article, irrespective of the number of figures in it.

Back to top

#### Preprint Policy

Springer accepts posting of preprints of primary research manuscripts on preprint servers, authors' or institutional websites. Details of our policy on posting, licensing, citation of preprints and communications with the media about preprints of primary research manuscripts may be found [here](#).

Authors should disclose details of preprint posting, including DOI and licensing terms, upon submission of the manuscript or at any other point during consideration at a Springer journal. Once the preprint is published, it is the author's responsibility to ensure that the preprint record is updated with a publication reference, including the DOI and a URL link to the published version of the article on the journal website.

Preprints may be cited in the reference list of articles under consideration at Springer journals as shown below:

Babichev, S. A., Ries, J. & Lvovsky, A. I. Quantum scissors: teleportation of single-mode optical states by means of a nonlocal single photon. Preprint at <http://arxiv.org/abs/quant-ph/0208066> (2002).

Back to top

Title page

Title Page

Please make sure your title page contains the following information.

Title

The title should be concise and informative.

Author information

The name(s) of the author(s)

The affiliation(s) of the author(s), i.e. institution, (department), city, (state), country

A clear indication and an active e-mail address of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

If address information is provided with the affiliation(s) it will also be published.

For authors that are (temporarily) unaffiliated we will only capture their city and country of residence, not their e-mail address unless specifically requested.

### Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

For life science journals only (when applicable)

Trial registration number and date of registration

Trial registration number, date of registration followed by “retrospectively registered”

### Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

### Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations'.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

To be used for all articles, including articles with biological applications

Funding (information that explains whether and by whom the research was supported)

Conflicts of interest/Competing interests (include appropriate disclosures)

Availability of data and material (data transparency)

Code availability (software application or custom code)

Authors' contributions (optional: please review the submission guidelines from the journal whether statements are mandatory)

Additional declarations for articles in life science journals that report the results of studies involving humans and/or animals

Ethics approval (include appropriate approvals or waivers)

Consent to participate (include appropriate statements)

Consent for publication (include appropriate statements)

Please see the relevant sections in the submission guidelines for further information as well as various examples of wording. Please revise/customize the sample statements according to your own needs.

Back to top

Text

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX. We recommend using Springer Nature's LaTeX template.

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

Please note:

Use the automatic page and line numbering function to number the pages and lines in your document.

Back to top

## References

1. All publications cited in the text should be presented in the list of references. The typescript should be carefully checked to ensure that the spelling of the authors' names and dates are exactly the same as in the reference list.
2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed, if necessary, by a short reference to appropriate pages. Examples: 'Peters (1985) has shown that . . . . 'This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1984, pp. 12--16)'
3. If reference is made in the text to a publication by three or more authors, the abbreviation et al. should be used. All names should be given in the list of references.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by authors' surname(s) and chronologically by author. If an author in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications by the single author, arranged according to publication dates; publications of the same author with co-authors. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1986a, 1986b, etc.
5. Use the following system for arranging each reference in the list:
  - For journal articles: Ahl, A.S., 1986. The role of vibrissae in behaviour: a status review, *Veterinary Research Communications*, 10, 245--268
  - For books: Fox, J.G., Cohen, B.J. and Lowe, F.M., 1984. *Laboratory Animal Medicine*, (Academic Press, London)
  - For a paper in published symposia proceedings or a chapter in multi-author books: Lowe, K.F. and Hamilton, B.A., 1986. Dairy pastures in the Australian tropics and subtropics. In: G.T. Murtagh and R.M. Jones (eds), *Proceedings of the 3rd Australian conference on tropical pastures*, Rockhampton, 1985, (Tropical Grassland Society of Australia, St. Lucia; Occasional Publication 3), 68--79
  - For unpublished theses, memoranda etc: Crowther, J., 1980. *Karst water studies and environment in West Malaysia*, (unpublished PhD thesis, University of Hull)
  - For Online documents: Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. <http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document>. Accessed 15 Jan 1999

6. Do not abbreviate the titles of journals mentioned in the list of references.

7. Titles of references should be given in the original language, except for the titles of publications in non-Latin alphabets, which should be transliterated, and a notation such as '(in Russian)' or '(in Greek, with English abstract)' added.

8. Citations of personal communications should be avoided unless absolutely necessary. When used, they should appear only in the text, using the format: 'E. Redpath, personal communication, 1986' and should not appear in the Reference List. Citations to the unpublished data of any of the authors should not be included unless the work has already been accepted for publication, in which case a reference should be given in the usual way with "in press" in place of the volume and page numbers.

Please pay attention to our policy regarding citations.

Back to top

Tables

All tables are to be numbered using Arabic numerals.

Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.

Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

Back to top

Artwork and Illustrations Guidelines

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

## Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

## Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

## Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

## Figure Lettering

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

## Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices [Supplementary Information (SI)] should, however, be numbered separately.

## Figure Captions

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

#### Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For large-sized journals the figures should be 84 mm (for double-column text areas), or 174 mm (for single-column text areas) wide and not higher than 234 mm.

For small-sized journals, the figures should be 119 mm wide and not higher than 195 mm.

#### Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Back to top

#### Supplementary Information (SI)

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Before submitting research datasets as Supplementary Information, authors should read the journal's Research data policy. We encourage research data to be archived in data repositories wherever possible.

#### Submission

Supply all supplementary material in standard file formats.

Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.

To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

High resolution (streamable quality) videos can be submitted up to a maximum of 25GB; low resolution videos should not be larger than 5GB.

#### Audio, Video, and Animations

Aspect ratio: 16:9 or 4:3

Maximum file size: 25 GB for high resolution files; 5 GB for low resolution files

Minimum video duration: 1 sec

Supported file formats: avi, wmv, mp4, mov, m2p, mp2, mpg, mpeg, flv, mxf, mts, m4v, 3gp

#### Text and Presentations

Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.

A collection of figures may also be combined in a PDF file.

#### Spreadsheets

Spreadsheets should be submitted as .csv or .xlsx files (MS Excel).

#### Specialized Formats

Specialized format such as .pdb (chemical), .vrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

#### Collecting Multiple Files

It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

#### Numbering

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.

Refer to the supplementary files as "Online Resource", e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4".

Name the files consecutively, e.g. "ESM\_3.mpg", "ESM\_4.pdf".

#### Captions

For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

#### Processing of supplementary files

Supplementary Information (SI) will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

#### Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material

Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

Back to top

#### Ethical Responsibilities of Authors

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation is helped by following the rules of good scientific practice, which include\*:

The manuscript should not be submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The submitted work should be original and should not have been published elsewhere in any form or language (partially or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work. (Please provide transparency on the re-use of material to avoid the concerns about text-recycling ('self-plagiarism').

A single study should not be split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (i.e. 'salami-slicing/publishing').

Concurrent or secondary publication is sometimes justifiable, provided certain conditions are met. Examples include: translations or a manuscript that is intended for a different group of readers.

Results should be presented clearly, honestly, and without fabrication, falsification or inappropriate data manipulation (including image based manipulation). Authors should adhere to discipline-specific rules for acquiring, selecting and processing data.

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author's own ('plagiarism'). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks (to indicate words taken from another source) are used for verbatim copying of material, and permissions secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Authors should make sure they have permissions for the use of software, questionnaires/(web) surveys and scales in their studies (if appropriate).

Research articles and non-research articles (e.g. Opinion, Review, and Commentary articles) must cite appropriate and relevant literature in support of the claims made. Excessive and inappropriate self-citation or coordinated efforts among several authors to collectively self-cite is strongly discouraged.

Authors should avoid untrue statements about an entity (who can be an individual person or a company) or descriptions of their behavior or actions that could potentially be seen as personal attacks or allegations about that person.

Research that may be misapplied to pose a threat to public health or national security should be clearly identified in the manuscript (e.g. dual use of research). Examples include creation of harmful consequences of biological agents or toxins, disruption of immunity of vaccines, unusual hazards in the use of chemicals, weaponization of research/technology (amongst others).

Authors are strongly advised to ensure the author group, the Corresponding Author, and the order of authors are all correct at submission. Adding and/or deleting authors during the revision stages is generally not permitted,

but in some cases may be warranted. Reasons for changes in authorship should be explained in detail. Please note that changes to authorship cannot be made after acceptance of a manuscript.

\*All of the above are guidelines and authors need to make sure to respect third parties rights such as copyright and/or moral rights.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results presented. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential or proprietary data is excluded.

If there is suspicion of misbehavior or alleged fraud the Journal and/or Publisher will carry out an investigation following COPE guidelines. If, after investigation, there are valid concerns, the author(s) concerned will be contacted under their given e-mail address and given an opportunity to address the issue. Depending on the situation, this may result in the Journal's and/or Publisher's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the manuscript is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction:

- an erratum/correction may be placed with the article

- an expression of concern may be placed with the article

- or in severe cases retraction of the article may occur.

The reason will be given in the published erratum/correction, expression of concern or retraction note. Please note that retraction means that the article is maintained on the platform, watermarked "retracted" and the explanation for the retraction is provided in a note linked to the watermarked article.

The author's institution may be informed

A notice of suspected transgression of ethical standards in the peer review system may be included as part of the author's and article's bibliographic record.

#### Fundamental errors

Authors have an obligation to correct mistakes once they discover a significant error or inaccuracy in their published article. The author(s) is/are requested to contact the journal and explain in what sense the error is impacting the article. A decision on how to correct the literature will depend on the nature of the error. This may be a correction or retraction. The retraction note should provide transparency which parts of the article are impacted by the error.

#### Suggesting / excluding reviewers

Authors are welcome to suggest suitable reviewers and/or request the exclusion of certain individuals when they submit their manuscripts. When suggesting reviewers, authors should make sure they are totally independent and

not connected to the work in any way. It is strongly recommended to suggest a mix of reviewers from different countries and different institutions. When suggesting reviewers, the Corresponding Author must provide an institutional email address for each suggested reviewer, or, if this is not possible to include other means of verifying the identity such as a link to a personal homepage, a link to the publication record or a researcher or author ID in the submission letter. Please note that the Journal may not use the suggestions, but suggestions are appreciated and may help facilitate the peer review process.

[Back to top](#)

### Authorship principles

These guidelines describe authorship principles and good authorship practices to which prospective authors should adhere to.

### Authorship clarified

The Journal and Publisher assume all authors agreed with the content and that all gave explicit consent to submit and that they obtained consent from the responsible authorities at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

The Publisher does not prescribe the kinds of contributions that warrant authorship. It is recommended that authors adhere to the guidelines for authorship that are applicable in their specific research field. In absence of specific guidelines it is recommended to adhere to the following guidelines\*:

All authors whose names appear on the submission

- 1) made substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data; or the creation of new software used in the work;
- 2) drafted the work or revised it critically for important intellectual content;
- 3) approved the version to be published; and
- 4) agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

\* Based on/adapted from:

ICMJE, Defining the Role of Authors and Contributors,

Transparency in authors' contributions and responsibilities to promote integrity in scientific publication, McNutt at all, PNAS February 27, 2018

### Disclosures and declarations

All authors are requested to include information regarding sources of funding, financial or non-financial interests, study-specific approval by the appropriate ethics committee for research involving humans and/or animals, informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals (as appropriate).

The decision whether such information should be included is not only dependent on the scope of the journal, but also the scope of the article. Work submitted for publication may have implications for public health or general welfare and in those cases it is the responsibility of all authors to include the appropriate disclosures and declarations.

### Data transparency

All authors are requested to make sure that all data and materials as well as software application or custom code support their published claims and comply with field standards. Please note that journals may have individual policies on (sharing) research data in concordance with disciplinary norms and expectations.

### Role of the Corresponding Author

One author is assigned as Corresponding Author and acts on behalf of all co-authors and ensures that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately addressed.

The Corresponding Author is responsible for the following requirements:

ensuring that all listed authors have approved the manuscript before submission, including the names and order of authors;

managing all communication between the Journal and all co-authors, before and after publication;\*

providing transparency on re-use of material and mention any unpublished material (for example manuscripts in press) included in the manuscript in a cover letter to the Editor;

making sure disclosures, declarations and transparency on data statements from all authors are included in the manuscript as appropriate (see above).

\* The requirement of managing all communication between the journal and all co-authors during submission and proofing may be delegated to a Contact or Submitting Author. In this case please make sure the Corresponding Author is clearly indicated in the manuscript.

### Author contributions

In absence of specific instructions and in research fields where it is possible to describe discrete efforts, the Publisher recommends authors to include contribution statements in the work that specifies the contribution of every author in order to promote transparency. These contributions should be listed at the separate title page.

Examples of such statement(s) are shown below:

- Free text:

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by [full name], [full name] and [full name]. The first draft of the manuscript was written by [full name] and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Example: CRediT taxonomy:

- Conceptualization: [full name], ...; Methodology: [full name], ...; Formal analysis and investigation: [full name], ...; Writing - original draft preparation: [full name, ...]; Writing - review and editing: [full name], ...; Funding acquisition: [full name], ...; Resources: [full name], ...; Supervision: [full name],....

For review articles where discrete statements are less applicable a statement should be included who had the idea for the article, who performed the literature search and data analysis, and who drafted and/or critically revised the work.

For articles that are based primarily on the student's dissertation or thesis, it is recommended that the student is usually listed as principal author:

A Graduate Student's Guide to Determining Authorship Credit and Authorship Order, APA Science Student Council 2006

#### Affiliation

The primary affiliation for each author should be the institution where the majority of their work was done. If an author has subsequently moved, the current address may additionally be stated. Addresses will not be updated or changed after publication of the article.

#### Changes to authorship

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, the Corresponding Author, and the order of authors at submission. Changes of authorship by adding or deleting authors, and/or changes in Corresponding Author, and/or changes in the sequence of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Please note that author names will be published exactly as they appear on the accepted submission!

Please make sure that the names of all authors are present and correctly spelled, and that addresses and affiliations are current.

Adding and/or deleting authors at revision stage are generally not permitted, but in some cases it may be warranted. Reasons for these changes in authorship should be explained. Approval of the change during revision

is at the discretion of the Editor-in-Chief. Please note that journals may have individual policies on adding and/or deleting authors during revision stage.

#### Author identification

Authors are recommended to use their ORCID ID when submitting an article for consideration or acquire an ORCID ID via the submission process.

#### Deceased or incapacitated authors

For cases in which a co-author dies or is incapacitated during the writing, submission, or peer-review process, and the co-authors feel it is appropriate to include the author, co-authors should obtain approval from a (legal) representative which could be a direct relative.

#### Authorship issues or disputes

In the case of an authorship dispute during peer review or after acceptance and publication, the Journal will not be in a position to investigate or adjudicate. Authors will be asked to resolve the dispute themselves. If they are unable the Journal reserves the right to withdraw a manuscript from the editorial process or in case of a published paper raise the issue with the authors' institution(s) and abide by its guidelines.

#### Confidentiality

Authors should treat all communication with the Journal as confidential which includes correspondence with direct representatives from the Journal such as Editors-in-Chief and/or Handling Editors and reviewers' reports unless explicit consent has been received to share information.

#### Back to top

#### Compliance with Ethical Standards

To ensure objectivity and transparency in research and to ensure that accepted principles of ethical and professional conduct have been followed, authors should include information regarding sources of funding, potential conflicts of interest (financial or non-financial), informed consent if the research involved human participants, and a statement on welfare of animals if the research involved animals.

Authors should include the following statements (if applicable) in a separate section entitled "Compliance with Ethical Standards" when submitting a paper:

#### Disclosure of potential conflicts of interest

#### Research involving Human Participants and/or Animals

#### Informed consent

Please note that standards could vary slightly per journal dependent on their peer review policies (i.e. single or double blind peer review) as well as per journal subject discipline. Before submitting your article check the instructions following this section carefully.

The corresponding author should be prepared to collect documentation of compliance with ethical standards and send if requested during peer review or after publication.

The Editors reserve the right to reject manuscripts that do not comply with the above-mentioned guidelines. The author will be held responsible for false statements or failure to fulfill the above-mentioned guidelines.

[Back to top](#)

#### Conflicts of Interest / Competing Interests

Authors are requested to disclose interests that are directly or indirectly related to the work submitted for publication. Interests within the last 3 years of beginning the work (conducting the research and preparing the work for submission) should be reported. Interests outside the 3-year time frame must be disclosed if they could reasonably be perceived as influencing the submitted work. Disclosure of interests provides a complete and transparent process and helps readers form their own judgments of potential bias. This is not meant to imply that a financial relationship with an organization that sponsored the research or compensation received for consultancy work is inappropriate.

Interests that should be considered and disclosed but are not limited to the following:

**Funding:** Research grants from funding agencies (please give the research funder and the grant number) and/or research support (including salaries, equipment, supplies, reimbursement for attending symposia, and other expenses) by organizations that may gain or lose financially through publication of this manuscript.

**Employment:** Recent (while engaged in the research project), present or anticipated employment by any organization that may gain or lose financially through publication of this manuscript. This includes multiple affiliations (if applicable).

**Financial interests:** Stocks or shares in companies (including holdings of spouse and/or children) that may gain or lose financially through publication of this manuscript; consultation fees or other forms of remuneration from organizations that may gain or lose financially; patents or patent applications whose value may be affected by publication of this manuscript.

It is difficult to specify a threshold at which a financial interest becomes significant, any such figure is necessarily arbitrary, so one possible practical guideline is the following: "Any undeclared financial interest that could embarrass the author were it to become publicly known after the work was published."

**Non-financial interests:** In addition, authors are requested to disclose interests that go beyond financial interests that could impart bias on the work submitted for publication such as professional interests, personal relationships or personal beliefs (amongst others). Examples include, but are not limited to: position on editorial board, advisory board or board of directors or other type of management relationships; writing and/or consulting for educational purposes; expert witness; mentoring relations; and so forth.

Primary research articles require a disclosure statement. Review articles present an expert synthesis of evidence and may be treated as an authoritative work on a subject. Review articles therefore require a disclosure

statement. Other article types such as editorials, book reviews, comments (amongst others) may, dependent on their content, require a disclosure statement. If you are unclear whether your article type requires a disclosure statement, please contact the Editor-in-Chief.

Please note that, in addition to the above requirements, funding information (given that funding is a potential conflict of interest (as mentioned above)) needs to be disclosed upon submission of the manuscript in the peer review system. This information will automatically be added to the Record of CrossMark, however it is not added to the manuscript itself. Under 'summary of requirements' (see below) funding information should be included in the 'Declarations' section.

#### Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Funding' and/or 'Conflicts of interests'/'Competing interests'. Other declarations include Ethics approval, Consent, Data, Material and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

When all authors have the same (or no) conflicts and/or funding it is sufficient to use one blanket statement.

Examples of statements to be used when funding has been received:

Partial financial support was received from [...]

The research leading to these results received funding from [...] under Grant Agreement No[...].

This study was funded by [...]

This work was supported by [...] (Grant numbers [...] and [...])

Examples of statements to be used when there is no funding:

The authors did not receive support from any organization for the submitted work.

No funding was received to assist with the preparation of this manuscript.

No funding was received for conducting this study.

No funds, grants, or other support was received.

Examples of statements to be used when there are interests to declare:

Financial interests: Author A has received research support from Company A. Author B has received a speaker honorarium from Company Wand owns stock in Company X. Author C is consultant to company Y.

Non-financial interests: Author C is an unpaid member of committee Z.

Financial interests: The authors declare they have no financial interests.

Non-financial interests: Author A is on the board of directors of Y and receives no compensation as member of the board of directors.

Financial interests: Author A received a speaking fee from Y for Z. Author B receives a salary from association X. X where s/he is the Executive Director.

Non-financial interests: none.

Financial interests: Author A and B declare they have no financial interests. Author C has received speaker and consultant honoraria from Company M and Company N. Dr. C has received speaker honorarium and research funding from Company M and Company O. Author D has received travel support from Company O.

Non-financial interests: Author D has served on advisory boards for Company M, Company N and Company O.

Examples of statements to be used when authors have nothing to declare:

The authors have no relevant financial or non-financial interests to disclose.

The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

All authors certify that they have no affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest or non-financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

The authors have no financial or proprietary interests in any material discussed in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Back to top

Research involving human participants, their data or biological material

Ethics approval

When reporting a study that involved human participants, their data or biological material, authors should include a statement that confirms that the study was approved (or granted exemption) by the appropriate institutional and/or national research ethics committee (including the name of the ethics committee) and certify that the study was performed in accordance with the ethical standards as laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the 1964 Helsinki Declaration or comparable standards, the authors must explain the reasons for their approach, and demonstrate that an independent ethics committee or institutional review board explicitly approved the doubtful aspects of the study. If a study was granted exemption from requiring ethics approval, this should also be detailed in the manuscript (including the reasons for the exemption).

Retrospective ethics approval

If a study has not been granted ethics committee approval prior to commencing, retrospective ethics approval usually cannot be obtained and it may not be possible to consider the manuscript for peer review. The decision on whether to proceed to peer review in such cases is at the Editor's discretion.

#### Ethics approval for retrospective studies

Although retrospective studies are conducted on already available data or biological material (for which formal consent may not be needed or is difficult to obtain) ethics approval may be required dependent on the law and the national ethical guidelines of a country. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their country.

#### Ethics approval for case studies

Case reports require ethics approval. Most institutions will have specific policies on this subject. Authors should check with their institution to make sure they are complying with the specific requirements of their institution and seek ethics approval where needed. Authors should be aware to secure informed consent from the individual (or parent or guardian if the participant is a minor or incapable) See also section on Informed Consent.

#### Cell lines

If human cells are used, authors must declare in the manuscript: what cell lines were used by describing the source of the cell line, including when and from where it was obtained, whether the cell line has recently been authenticated and by what method. If cells were bought from a life science company the following need to be given in the manuscript: name of company (that provided the cells), cell type, number of cell line, and batch of cells.

It is recommended that authors check the NCBI database for misidentification and contamination of human cell lines. This step will alert authors to possible problems with the cell line and may save considerable time and effort.

Further information is available from the International Cell Line Authentication Committee (ICLAC).

Authors should include a statement that confirms that an institutional or independent ethics committee (including the name of the ethics committee) approved the study and that informed consent was obtained from the donor or next of kin.

#### Research Resource Identifiers (RRID)

Research Resource Identifiers (RRID) are persistent unique identifiers (effectively similar to a DOI) for research resources. This journal encourages authors to adopt RRIDs when reporting key biological resources (antibodies, cell lines, model organisms and tools) in their manuscripts.

Examples:

Organism: *Filip1tm1a(KOMP)Wtsi* RRID:MMRRC\_055641-UCD

Cell Line: RST307 cell line RRID:CVCL\_C321

Antibody: Luciferase antibody DSHB Cat# LUC-3, RRID:AB\_2722109

Plasmid: mRuby3 plasmid RRID:Addgene\_104005

Software: ImageJ Version 1.2.4 RRID:SCR\_003070

RRIDs are provided by the Resource Identification Portal. Many commonly used research resources already have designated RRIDs. The portal also provides authors links so that they can quickly register a new resource and obtain an RRID.

### Clinical Trial Registration

The World Health Organization (WHO) definition of a clinical trial is "any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes". The WHO defines health interventions as "A health intervention is an act performed for, with or on behalf of a person or population whose purpose is to assess, improve, maintain, promote or modify health, functioning or health conditions" and a health-related outcome is generally defined as a change in the health of a person or population as a result of an intervention.

To ensure the integrity of the reporting of patient-centered trials, authors must register prospective clinical trials (phase II to IV trials) in suitable publicly available repositories. For example [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) or any of the primary registries that participate in the WHO International Clinical Trials Registry Platform.

The trial registration number (TRN) and date of registration should be included as the last line of the manuscript abstract.

For clinical trials that have not been registered prospectively, authors are encouraged to register retrospectively to ensure the complete publication of all results. The trial registration number (TRN), date of registration and the words 'retrospectively registered' should be included as the last line of the manuscript abstract.

### Standards of reporting

Springer Nature advocates complete and transparent reporting of biomedical and biological research and research with biological applications. Authors are recommended to adhere to the minimum reporting guidelines hosted by the EQUATOR Network when preparing their manuscript.

Exact requirements may vary depending on the journal; please refer to the journal's Instructions for Authors.

Checklists are available for a number of study designs, including:

Randomised trials (CONSORT) and Study protocols (SPIRIT)

Observational studies (STROBE)

Systematic reviews and meta-analyses (PRISMA) and protocols (Prisma-P)

Diagnostic/prognostic studies (STARD) and (TRIPOD)

Case reports (CARE)

Clinical practice guidelines (AGREE) and (RIGHT)

Qualitative research (SRQR) and (COREQ)

Animal pre-clinical studies (ARRIVE)

Quality improvement studies (SQUIRE)

Economic evaluations (CHEERS)

Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study was approved by the Bioethics Committee of the Medical University of A (No. ...).
- This study was performed in line with the principles of the Declaration of Helsinki. Approval was granted by the Ethics Committee of University B (Date.../No. ...).

- Approval was obtained from the ethics committee of University C. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki.
- The questionnaire and methodology for this study was approved by the Human Research Ethics committee of the University of D (Ethics approval number: ...).

Examples of statements to be used for a retrospective study:

- Ethical approval was waived by the local Ethics Committee of University A in view of the retrospective nature of the study and all the procedures being performed were part of the routine care.
- This research study was conducted retrospectively from data obtained for clinical purposes. We consulted extensively with the IRB of XYZ who determined that our study did not need ethical approval. An IRB official waiver of ethical approval was granted from the IRB of XYZ.
- This retrospective chart review study involving human participants was in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The Human Investigation Committee (IRB) of University B approved this study.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- This is an observational study. The XYZ Research Ethics Committee has confirmed that no ethical approval is required.
- The data reproduced from Article X utilized human tissue that was procured via our Biobank AB, which provides de-identified samples. This study was reviewed and deemed exempt by our XYZ Institutional Review Board. The BioBank protocols are in accordance with the ethical standards of our institution and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

[Back to top](#)

Informed consent

All individuals have individual rights that are not to be infringed. Individual participants in studies have, for example, the right to decide what happens to the (identifiable) personal data gathered, to what they have said during a study or an interview, as well as to any photograph that was taken. This is especially true concerning

images of vulnerable people (e.g. minors, patients, refugees, etc) or the use of images in sensitive contexts. In many instances authors will need to secure written consent before including images.

Identifying details (names, dates of birth, identity numbers, biometrical characteristics (such as facial features, fingerprint, writing style, voice pattern, DNA or other distinguishing characteristic) and other information) of the participants that were studied should not be published in written descriptions, photographs, and genetic profiles unless the information is essential for scholarly purposes and the participant (or parent/guardian if the participant is a minor or incapable or legal representative) gave written informed consent for publication. Complete anonymity is difficult to achieve in some cases. Detailed descriptions of individual participants, whether of their whole bodies or of body sections, may lead to disclosure of their identity. Under certain circumstances consent is not required as long as information is anonymized and the submission does not include images that may identify the person.

Informed consent for publication should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of participants is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic profiles, authors should provide assurance that alterations do not distort meaning.

Exceptions where it is not necessary to obtain consent:

- Images such as x rays, laparoscopic images, ultrasound images, brain scans, pathology slides unless there is a concern about identifying information in which case, authors should ensure that consent is obtained.
- Reuse of images: If images are being reused from prior publications, the Publisher will assume that the prior publication obtained the relevant information regarding consent. Authors should provide the appropriate attribution for republished images.

Consent and already available data and/or biologic material

Regardless of whether material is collected from living or dead patients, they (family or guardian if the deceased has not made a pre-mortem decision) must have given prior written consent. The aspect of confidentiality as well as any wishes from the deceased should be respected.

Data protection, confidentiality and privacy

When biological material is donated for or data is generated as part of a research project authors should ensure, as part of the informed consent procedure, that the participants are made aware what kind of (personal) data will be processed, how it will be used and for what purpose. In case of data acquired via a biobank/biorepository, it is possible they apply a broad consent which allows research participants to consent to a broad range of uses of their data and samples which is regarded by research ethics committees as specific enough to be considered “informed”. However, authors should always check the specific biobank/biorepository policies or any other type of data provider policies (in case of non-bio research) to be sure that this is the case.

### Consent to Participate

For all research involving human subjects, freely-given, informed consent to participate in the study must be obtained from participants (or their parent or legal guardian in the case of children under 16) and a statement to this effect should appear in the manuscript. In the case of articles describing human transplantation studies, authors must include a statement declaring that no organs/tissues were obtained from prisoners and must also name the institution(s)/clinic(s)/department(s) via which organs/tissues were obtained. For manuscripts reporting studies involving vulnerable groups where there is the potential for coercion or where consent may not have been fully informed, extra care will be taken by the editor and may be referred to the Springer Nature Research Integrity Group.

### Consent to Publish

Individuals may consent to participate in a study, but object to having their data published in a journal article. Authors should make sure to also seek consent from individuals to publish their data prior to submitting their paper to a journal. This is in particular applicable to case studies. A consent to publish form can be found

### Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Consent to participate' and/or 'Consent to publish'. Other declarations include Funding, Conflicts of interest/competing interests, Ethics approval, Consent, Data and/or Code availability and Authors' contribution statements.

Please see the various examples of wording below and revise/customize the sample statements according to your own needs.

### Sample statements for "Consent to participate":

Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

Informed consent was obtained from legal guardians.

Written informed consent was obtained from the parents.

Verbal informed consent was obtained prior to the interview.

### Sample statements for "Consent to publish":

The authors affirm that human research participants provided informed consent for publication of the images in Figure(s) 1a, 1b and 1c.

The participant has consented to the submission of the case report to the journal.

Patients signed informed consent regarding publishing their data and photographs.

Sample statements if identifying information about participants is available in the article:

Additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

Images will be removed from publication if authors have not obtained informed consent or the paper may be removed and replaced with a notice explaining the reason for removal.

Back to top

Research involving animals, their data or biological material

The welfare of animals (vertebrate and higher invertebrate) used for research, education and testing must be respected. Authors should supply detailed information on the ethical treatment of their animals in their submission. For that purpose they may use the ARRIVE checklist which is designed to be used when submitting manuscripts describing animal research.

For studies involving client-owned animals, authors must also document informed consent from the client or owner and adherence to a high standard (best practice) of veterinary care.

Authors are recommended to comply with:

- The International Union for Conservation of Nature (IUCN) Policy Statement on Research Involving Species at Risk of Extinction and consult the IUCN red list index of threatened species.
- Convention on the Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

When reporting results authors should indicate:

- ... that the studies have been approved by a research ethics committee at the institution or practice at which the studies were conducted. Please provide the name of ethics committee and relevant permit number;

- ... whether the legal requirements or guidelines in the country and/or state or province for the care and use of animals have been followed.

Researchers from countries without any legal requirements or guidelines voluntarily should refer to the following sites for guidance:

- The Basel Declaration describes fundamental principles of using animals in biomedical research
- The International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS) provides ethical guidelines for researchers as well as editors and reviewers
- The Association for the study of Animal Behaviour describes ethical guidelines for the treatment of animals in research and teaching
- The International Association of Veterinary Editors' Consensus Author Guidelines on Animal Ethics provide guidelines for authors on animal ethics and welfare

Researchers may wish to consult the most recent (ethical) guidelines available from relevant taxon-oriented professional societies.

If a study was granted exemption or did not require ethics approval, this should also be detailed in the manuscript.

#### Summary of requirements

The above should be summarized in a statement and placed in a 'Declarations' section before the reference list under a heading of 'Ethics approval'.

Examples of statements to be used when ethics approval has been obtained:

- All procedures involving animals were in compliance with the European Community Council Directive of 24 November 1986, and ethical approval was granted by the Kocaeli University Ethics Committee (No. 29 12 2014, Kocaeli, Turkey).
- All procedures performed in the study were in accordance with the ARVO Statement for Use of Animals in Ophthalmic Vision and Research. The ethical principles established by the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8523, revised 2011) were followed. The research protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use (Protocol No. 06174/14) of FCAV/Unesp, Jaboticabal.

- This study involved a questionnaire-based survey of farmers as well as blood sampling from their animals. The study protocol was assessed and approved by Haramaya University, research and extension office. Participants provided their verbal informed consent for animal blood sampling as well as for the related survey questions. Collection of blood samples was carried out by veterinarians adhering to the regulations and guidelines on animal husbandry and welfare.
- All brown bear captures and handling were approved by the Ethical Committee on Animal Experiments, Uppsala, Sweden (Application C18/15) and the Swedish Environmental Protection Agency in compliance with Swedish laws and regulations.
- The ethics governing the use and conduct of experiments on animals were strictly observed, and the experimental protocol was approved by the University of Maiduguri Senate committee on Medical Research ethics. Proper permit and consent were obtained from the Maiduguri abattoir management, before the faecal samples of the cattle and camels slaughtered in this abattoir were used for this experiment.

Examples of statements to be used when no ethical approval is required/exemption granted:

- No approval of research ethics committees was required to accomplish the goals of this study because experimental work was conducted with an unregulated invertebrate species.
- As the trappings of small mammals were conducted as part of regular pest control measures in accordance with the NATO Standardized Agreement 2048 "Deployment Pest and Vector Surveillance and Control ", no approval by an ethics committee was required.
- All experiments have been conducted as per the guidelines of the Institutional Animal Ethics Committee, Department of Zoology, Utkal University, Bhubaneswar, Odisha, India. However, the insect species used in this study is reared for commercial production of raw silk materials, as a part of agro-based industry. Therefore, use of this animal in research does not require ethical clearance. We have obtained permission from the office of Research officer sericulture, Baripada, Orissa, India for the provision of infrastructure and support for rearing of silkworm both in indoor and outdoor conditions related to our study to promote sericulture practices.

Authors are responsible for correctness of the statements provided in the manuscript. See also Authorship Principles. The Editor-in-Chief reserves the right to reject submissions that do not meet the guidelines described in this section.

[Back to top](#)

[After acceptance](#)

Upon acceptance, your article will be exported to Production to undergo typesetting. Once typesetting is complete, you will receive a link asking you to confirm your affiliation, choose the publishing model for your article as well as arrange rights and payment of any associated publication cost.

Once you have completed this, your article will be processed and you will receive the proofs.

#### Article publishing agreement

Depending on the ownership of the journal and its policies, you will either grant the Publisher an exclusive licence to publish the article or will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher.

#### Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

#### Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

#### Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

#### Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

#### Back to top

#### Open Choice

Open Choice allows you to publish open access in more than 1850 Springer Nature journals, making your research more visible and accessible immediately on publication.

Article processing charges (APCs) vary by journal – view the full list

#### Benefits:

Increased researcher engagement: Open Choice enables access by anyone with an internet connection, immediately on publication.

Higher visibility and impact: In Springer hybrid journals, OA articles are accessed 4 times more often on average, and cited 1.7 more times on average\*.

Easy compliance with funder and institutional mandates: Many funders require open access publishing, and some take compliance into account when assessing future grant applications.

It is easy to find funding to support open access – please see our funding and support pages for more information.

\*) Within the first three years of publication. Springer Nature hybrid journal OA impact analysis, 2018.

Open Choice

Funding and Support pages

Copyright and license term – CC BY

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Find more about the license agreement

Back to top

Research Data Policy and Data Availability Statements

This journal operates a type 3 research data policy. A submission to the journal implies that materials described in the manuscript, including all relevant raw data, will be freely available to any researcher wishing to use them for non-commercial purposes, without breaching participant confidentiality.

Data availability

All original research must include a data availability statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article can be found, if applicable. Statements should include, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. For the purposes of the data availability statement, “data” is defined as the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. When it is not possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access. Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

1. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
2. The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

3. All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
4. The datasets generated during and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON(S) WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.].
5. Data sharing not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
6. The data that support the findings of this study are available from [THIRD PARTY NAME] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under licence for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [THIRD PARTY NAME].

More templates for data availability statements, including examples of openly available and restricted access datasets, are available here:

Data availability statements

Data repositories

This journal strongly encourages that all datasets on which the conclusions of the paper rely are available to readers. We encourage authors to ensure that their datasets are either deposited in publicly available repositories (where available and appropriate) or presented in the main manuscript or additional supporting files whenever possible. Please see Springer Nature's information on recommended repositories.

List of Repositories

General repositories - for all types of research data - such as figshare and Dryad may be used where appropriate.

Data citation

The journal also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI), should be included in the reference list using the minimum information recommended by DataCite, and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs.

Research data and peer review

Peer reviewers are encouraged to check the manuscript's Data availability statement, where applicable. They should consider if the authors have complied with the journal's policy on the availability of research data, and whether reasonable effort has been made to make the data that support the findings of the study available for

replication or reuse by other researchers. Peer reviewers are entitled to request access to underlying data (and code) when needed for them to perform their evaluation of a manuscript.

If the journal that you're submitting to uses double-blind peer review and you are providing reviewers with access to your data (for example via a repository link, supplementary information or data on request), it is strongly suggested that the authorship in the data is also blinded. There are data repositories that can assist with this and/or will create a link to mask the authorship of your data.

Authors who need help understanding our data sharing policies, help finding a suitable data repository, or help organising and sharing research data can access our Author Support portal for additional guidance.

For more information:

<http://www.springernature.com/gp/group/data-policy/faq>

Back to top

English Language Editing

For editors and reviewers to accurately assess the work presented in your manuscript you need to ensure the English language is of sufficient quality to be understood. If you need help with writing in English you should consider:

Getting a fast, free online grammar check.

Asking a colleague who is proficient in English to review your manuscript for clarity.

Visiting the English language tutorial which covers the common mistakes when writing in English.

Using a professional language editing service where editors will improve the English to ensure that your meaning is clear and identify problems that require your review. Two such services are provided by our affiliates Nature Research Editing Service and American Journal Experts. Springer authors are entitled to a 10% discount on their first submission to either of these services, simply follow the links below.

Free online grammar check

English language tutorial

Nature Research Editing Service

American Journal Experts

Please note that the use of a language editing service is not a requirement for publication in this journal and does not imply or guarantee that the article will be selected for peer review or accepted.