

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

Naiéli Schiefelbein Souto

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS
RESULTANTES DA EXPOSIÇÃO AGUDA À AFLATOXINA B1 EM
RATOS**

Santa Maria, RS,

2016

Naiéli Schiefelbein Souto

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS RESULTANTES DA
EXPOSIÇÃO AGUDA À AFLATOXINA B1 EM RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Flávia Furian

Santa Maria, RS.

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Schiefelbein Souto, Naiéli
EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS RESULTANTES DA
EXPOSIÇÃO AGUDA À AFLATOXINA B1 EM RATOS / Naiéli
Schiefelbein Souto.-2016.
92 p.; 30cm

Orientador: Ana Flavia Furian
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

1. Micotoxina 2. Intoxicação aguda 3. Estresse
oxidativo 4. Sistema Nervoso Central 5. Proteína Quinase
I. Furian, Ana Flavia II. Título.

© 2015

Todos os direitos autorais reservados a Naiéli Schiefelbein Souto. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: naieli.s.souto@gmail.com

Naiéli Schiefelbein Souto

**EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS RESULTANTES DA
EXPOSIÇÃO AGUDA À AFLATOXINA B1 EM RATOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**

Aprovado em 08 de março de 2016:

Ana Flávia Furian, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Silvana Peterini Boeira, Dra. (UNIPAMPA)

Danieli Valnes Magni, Dra.

Santa Maria
2016

Aos meus pais, Ilton e Jovânia, meus exemplos, pelo incentivo, amor e apoio incondicional durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por prover tudo que preciso para ser feliz me dando força para superar todas as dificuldades.

À minha orientadora, Prof^ª. Dra Ana Flávia Furian, pela oportunidade de entrar no grupo de pesquisa desde a graduação, pois com toda certeza me tornaram uma pessoa muito mais preparada, levarei sempre comigo seu exemplo de pessoa, competência profissional, caráter, humildade, amizade e especialmente pela paciência. Minha gratidão e todo o meu respeito.

Ao Prof. Dr. Mauro Oliveira por toda ajuda prestada no decorrer de meu trabalho, com sugestões, aprimoramentos, explicações que com certeza o enriqueceram.

Aos meus pais, Ilton e Jovânia que são as pessoas mais importantes na minha vida, meus exemplos, por me incentivar sempre em seguir em frente e lutar por cada um dos meus sonhos, abrindo mão de muitas coisas para que eu pudesse chegar até aqui e ir mais além inclusive, pelo amor, carinho, segurança, palavras de incentivo, por todos os bolos e congelados e a preocupação de que se eu estava realmente bem. Amo muito vocês.

A Ana, minha companheira que fez meus dias muito mais leves, “coisinha” te agradeço pela amizade, pelo companheirismo, dedicação, incentivo, otimismo, bom humor, por todas as incansáveis vezes que pensamos sobre as diluições, quero que saiba que é muito bom trabalhar com você e pode contar comigo sempre. O maior presente será seguirmos nosso trabalho por mais alguns anos!

Aos meus colegas de laboratório LABNEURO, Vinicius, Leandro, Clarissa, Jéssica, Cleide, Fernanda, Thaize e Ana, pela convivência, ensinamentos, auxílio. A Mayara pela amizade, dicas, ensinamentos, paciência, bom humor e apoio. Muito obrigada!

Minhas gatas do lab. 108 Aline, Érica e Aline por toda a ajuda e companheirismo que possamos partilhar ainda mais conhecimentos e histórias. Obrigada por tudo!

Aos meus amados da família #TP que fizeram essa jornada muito mais prazerosa e feliz, uma honra ter todos vocês em minha vida Thai Mari, Fê, Ká, Fran, Angela, Jamila, Camila, Marcelo, Augusto meu muitíssimo obrigado a cada um de vocês.

A Thai em especial por me fazer companhia nos dias de dissertar, distrair, pingar, divertir, aconselhar, escutar e principalmente ajudar em todas as coisas, tua amizade fez total diferença pode ter certeza. Obrigada migs!

A juh e Aline por estarem sempre ao meu lado, companheirismo que vem da graduação e vai seguir por toda vida!

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em Alimentos, pela oportunidade e oferta de ensino de qualidade.

A CAPES, CNPq e a FAPERGS, que garantiram o sustento financeiro necessário à realização deste trabalho de mestrado.

A todos que de alguma maneira me ajudaram e me acompanharam na realização deste trabalho, quero agradecer e compartilhar esta vitória. **MUITO OBRIGADO!!**

Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo.
Todos nós sabemos alguma coisa. Todos nós
ignoramos algumas coisas. Por isso
aprendemos sempre.

Paulo Freire

RESUMO

EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS RESULTANTES DA EXPOSIÇÃO AGUDA À AFLATOXINA B1 EM RATOS

AUTORA: Naiéli Schiefelbein Souto
ORIENTADORA: Ana Flávia Furian

Aflatoxinas são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. A aflatoxina B1 (AFB1) é a micotoxina mais frequente e altamente tóxica, apresenta efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Esta micotoxina tem sido detectada em culturas de importância em todo o mundo, como milho, amendoim, feijão, arroz, trigo, algodão, sorgo, frutas e também em rações de animais. A AFB1 é convertida no fígado em 8,9-epóxido, um metabólito que reage com macromoléculas celulares, incluindo proteínas, RNA e DNA. Além disso, altera parâmetros hematológicos e promove um desequilíbrio no sistema oxidativo, especialmente nas enzimas antioxidantes. Assim, o objetivo do nosso trabalho é avaliar o efeito agudo causado pela administração oral de AFB1 no comportamento dos animais bem como em parâmetros bioquímicos. Foram utilizados ratos Wistar machos, jovens, que receberam uma administração de AFB1 (250 µg/kg), e após 48 horas foram submetidos à análise comportamental, e determinação de parâmetros bioquímicos no córtex cerebral, como as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e glutationa-S-transferase (GST), carbonilação proteica e níveis de 3-nitrotirosina, atividade da enzima Na⁺/K⁺ ATPase, determinação de ácido ascórbico, determinação de tióis não-proteicos (NPSH) e avaliação da peroxidação lipídica (TBARS), bem como alterações na imunorreatividade da proteína quinase A (PKA-Ser96) e proteína quinase C (PKC-Ser957). Os resultados mostram que a intoxicação aguda por AFB1 causa efeitos neurotóxicos evidenciados pela redução significativa nos níveis de ácido ascórbico e grupos tióis não proteicos, acompanhados do aumento da imunorreatividade da relação da proteína quinase C fosforilada/total (p-PKC α Ser957/PKC α). Neste protocolo de intoxicação aguda, a AFB1 se mostrou capaz de desencadear efeitos tóxicos no sistema nervoso central, sem causar alterações comportamentais.

Palavras-chave: Micotoxina. Intoxicação aguda. Sistema Nervoso Central. Estresse oxidativo. Proteína quinase.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL AND BEHAVIORAL EFFECTS RESULTING FROM ACUTE EXPOSURE TO AFLATOXIN B1 IN RATS

AUTHOR: Naiéli Schiefelbein Souto
ADVISOR: Ana Flávia Furian

Aflatoxins are mainly produced by *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. Aflatoxin B1 (AFB1) is the most common mycotoxin and highly toxic, causing carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects. This mycotoxin has been detected in important crops worldwide, including corn, peanuts, beans, rice, wheat, cotton, sorghum, fruits and also in animal feed. The AFB1 is converted in the liver into 8,9-epoxide, a metabolite which react with cellular macromolecules, including proteins, RNA and DNA. In addition, it changes hematologic parameters and promotes an imbalance in the oxidative system, especially in antioxidant enzymes. Therefore, the aim of our study was to evaluate the acute effects caused by oral administration of AFB1 on behavioral tests and biochemical parameters. Were used young male Wistar rats that received an administration of AFB1 (250 µg / kg) and after 48 hours were submitted to behavioral analysis, determination of biochemical parameters on cerebral cortex as antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD) and glutathione S-transferase (GST), protein carbonyls and levels of 3-nitrotyrosine, Na⁺, K⁺-ATPase activity, determination of ascorbic acid, determination of non-protein sulfhydryl groups (NPSH) and lipoperoxidation, (TBARS) as well as changes in immunoreactivity of protein kinase A (PKA-Ser96) and protein kinase C (PKC-Ser957). The results show that the acute intoxication by AFB1 causes neurotoxic effects, evidenced by significant reduction in the levels of ascorbic acid and non-protein sulfhydryl groups, accompanied by the increase in immunoreactivity ratio of protein kinase C phosphorylated/total (p-PKC α Ser957/PKC α). In this acute protocol AFB1 was able to cause toxic effects in the central nervous system without any behavioral alteration.

Keywords: Mycotoxin. Acute intoxication. Central Nervous System. Oxidative stress. Protein kinase.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Representação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). 27

RESULTADOS – ARTIGO

Figure 1: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition in (A) non protein thiols (NPSH) and (B) ascorbic acid content on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group. * Indicates a significant difference compared to vehicle group. 63

Figure 2: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on (A) protein carbonyl content and (B) 3-nitrotyrosine (3-NT) content on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 6 animals in each group. 64

Figure 3: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on (A) total activity of Na⁺,K⁺-ATPase, (B) α1 activity and (C) α2/α3 activity on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group. 65

Figure 4: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on the levels of (A) p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio and (B) p-PKA Ser96 /PKA II α subunit ratio on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 5-6 animals in each group. * Indicates a significant difference compared to vehicle group. 66

LISTA TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Limites máximos tolerados (LMT) de concentração de aflatoxinas no Brasil em diferentes alimentos.....22

Tabela 2: Valores da dose média para a produção de tumores (DT_{50}) após ingestão prolongada da Aflatoxina B1 na dieta, para diversos animais26

RESULTADOS – ARTIGO

Table 1: Effect of aflatoxin B1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{p.o.}$) 48h after exposition on open field test. Data are presented as Mean \pm S.E.M. for 11 animals in each group67

Table 2: Effect of aflatoxin B1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{p.o.}$) 48h after exposition in novel object recognition, forced swim test and taste preference sucrose test. Data are presented as Mean \pm S.E.M. for 6-10 animals in each group.....67

Table 3: Effect of aflatoxin B1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{p.o.}$) 48h after exposition on elevated plus maze test. Data are presented as Mean \pm S.E.M. for 5 animals in each group68

Table 4: Effect of aflatoxin B1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{p.o.}$) 48h after exposition on TBARS content, SOD and GST activities on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean \pm S.E.M. for 10 animals in each group.68

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------------------|---------------------------------|
| AFB1 | Aflatoxina B1 |
| AFB2 | Aflatoxina B2 |
| AFM1 | Aflatoxina M1 |
| AFP1 | Aflatoxina P1 |
| AFQ1 | Aflatoxina Q1 |
| ALT | Alanina Aminotransferase |
| AST | Aspartato Aminotransferase |
| ATP | Adenosina Trifosfato |
| Ca²⁺ | Cálcio |
| CAT | Catalase |
| CYP | Funções oxidases mistas |
| DA | Dopamina |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DOPAC | Ácido 3,4-diidroxifenilacético |
| ERNs | Espécies reativas de nitrogênio |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FAL | Fosfatase Alcalina |
| GPx | Glutationa Peroxidase |
| GSH | Glutationa |
| H₂O₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| i.p. | Intraperitoneal |
| K⁺ | Potássio |
| MDA | Malonaldeído |
| Na⁺ | Sódio |
| NE | Norepinefrina |
| O₂ | Oxigênio |
| O₂• | Radical Superóxido |
| RL | Radical livre |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| SNC | Sistema Nervoso Central |
| SOD | Superóxido Dismutase |
| v.o. | Via Oral |
| γ-GT | Gamaglutamiltransferase |
| •OH | Radical hidroxila |
| PKC | Proteína quinase C |
| PKA | Proteína quinase A |
| DT50 | Dose toxica 50% |
| 5HT | Serotonina |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 18 |
| 2.1 | MICOTOXINAS | 18 |
| 2.2 | AFLATOXINAS | 19 |
| 2.2.1 | Metabolismo das aflatoxinas..... | 22 |
| 2.2.2 | Toxicidade das aflatoxinas | 24 |
| 2.3 | ESTRESSE OXIDATIVO E AFLATOXINAS | 26 |
| 2.4 | NEUROTOXICIDADE E AFLATOXINA..... | 29 |
| 2.5 | AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS | 31 |
| 2.5.1 | Memória..... | 32 |
| 2.5.2 | Ansiedade e medo | 33 |
| 2.5.3 | Depressão..... | 34 |
| 2.5.4 | Atividade locomotora e exploratória | 34 |
| 2.6 | NA ⁺ ,K ⁺ -ATPASE | 35 |
| 2.7 | CONTAMINANTES DE ALIMENTOS E PROBLEMAS DE SAÚDE | 36 |
| 3 | OBJETIVOS | 38 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 38 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 38 |
| 4 | ARTIGO CIENTÍFICO..... | 40 |
| 5 | CONCLUSÕES..... | 70 |
| | REFERÊNCIAS..... | 72 |
| | ANEXO..... | 90 |
| | ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS | 91 |

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos e os produtos processados estão sujeitos à contaminação por diversas substâncias altamente tóxicas, as quais não irão representar somente problemas na qualidade dos produtos finais, como também causar diversos transtornos ao organismo do homem e dos animais, configurando assim um sério problema para saúde pública em todo mundo. Dentre as diferentes substâncias capazes de provocar problemas pela ingestão de alimentos contaminados estão os fungos e seus metabólitos secundários, as micotoxinas (KLICH, 2003).

As micotoxinas apresentam um amplo espectro de toxicidade, não-imunogenicidade, são termoestáveis, apresentam baixo peso molecular e atuam em baixas concentrações (BIEHL, 1987; BOK e KELLER, 2004). Os diferentes efeitos ocasionados pelas micotoxinas se devem às suas diferenças na estrutura química, as quais são influenciadas pelos organismos animais que as ingerem, pela diversidade de espécies, raça, sexo, idade, fatores ambientais, manejo, condições nutricionais (HAYES, 1986).

Dentre as centenas de micotoxinas, as aflatoxinas têm recebido grande atenção em comparação com as demais, pois apresentam maior número de resultados positivos em alimentos. São metabólitos secundários biologicamente ativos, e em sua maioria produzidos por certas espécies de fungos *Aspergillus* (BEDARD, 2006), principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. (VARGA, 2009; COPPOCK, 2012). Há muitos tipos de aflatoxinas, entre elas a aflatoxina B1, B2, G1, G2 e, dentre as quais a aflatoxina B1 (AFB1) é a mais frequente e tóxica do grupo (WOGAN *et al.*, 1971; ABDEL-WAHHAB *et al.*, 1998).

A contaminação de alimentos por aflatoxinas continua a ser um importante problema de saúde pública no mundo, especialmente no mundo em desenvolvimento, onde foi relatado que a exposição à aflatoxina é associada com aproximadamente 40% das doenças (WILLIAMS *et al.*, 2004a). Além de problemas de saúde, a presença de aflatoxinas em diferentes fontes alimentícias provoca perdas econômicas consideráveis, visto que lotes contaminados devem ser descartados do mercado. A FAO (Food and Agriculture Organization) avalia uma perda mundial de 25% dos grãos produzidos (BENNETT, 2003).

A incidência de aflatoxinas encontradas em produtos alimentares é bem variável, na Itália cerca de 5.0% dos alimentos está contaminado (IMPERATO *et al.*, 2011), no Paquistão 29.4% (LUTTFULLAH e HUSSAIN, 2011), na Malásia 16.3% (LEONG *et al.*, 2010), Coréia do Sul 10.5% (CHUN *et al.*, 2007). No Brasil, já foram relatados contaminações em São Paulo, onde foram encontradas concentrações de 6.05 mg/kg⁻¹ (OLIVEIRA, *et al.*, 2009), em

Minas Gerais de $56.4 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (ROCHA, 2008) e no Rio Grande do Sul $16.2 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ (OLIVEIRA, 2011).

Estas micotoxinas podem estar presentes em diferentes fontes alimentares, tais como especiarias, grãos de cereais, sementes oleaginosas, milho e produtos de milho, caroço de algodão, amendoim e produtos de amendoim, nozes, bebidas fermentadas feitas a partir de grãos, leite, queijo, carne, nozes, e sucos de fruta podem ser contaminados com aflatoxinas (BULLERMAN, 1986). A contaminação é maior em plantas cultivadas em climas quentes, úmidos e tropicais em geral, mas também pode ocorrer em climas temperados que variam de ano para ano (IARC, 1976; PROGRAM, 2011).

Após a exposição e absorção, a AFB1 é metabolizada no fígado pelo sistema do citocromo P450 para o metabólito altamente reativo AFB1-8,9-epóxido, o qual é responsável pela toxicidade (GARNER, 1979; WILLIAMS *et al.*, 2004b). O metabólito 8,9-epóxido é eliminado por conjugação com glutathione, em uma reação mediada pela enzima glutathione-S-transferase.

A AFB1 é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) como Grupo 1 de carcinógenos humanos (IARC, 1993a). Os sintomas da aflatoxicose aguda em humanos manifestam-se por vômitos, dor abdominal, edema pulmonar, coma, convulsões, morte com edema cerebral, acúmulo de gordura no fígado, rins e coração (STROSNIDER *et al.*, 2006b).

Ainda não há estudos que investiguem se a AFB1 induz déficits cognitivos e comportamentais, mas sabe-se que esta micotoxina provoca uma alteração no metabolismo do triptofano no cérebro, o que diminui as concentrações de serotonina (KIMBROUGH *et al.*, 1992a). A serotonina é sintetizada a partir do triptofano, e armazenada em vários sítios do corpo. Possui múltiplos papéis fisiológicos, incluindo percepção da dor, comportamento normal e anormal, distúrbios afetivos e regulação do sono.

Entre os mecanismos de toxicidade induzidos pela AFB1 o estresse oxidativo já se destaca (SOUZA *et al.*, 1999). O estresse oxidativo se dá pela geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que domina a capacidade do sistema para neutralizá-las e eliminá-las. EROs são os radicais livres de ânions reativos formados pela incompleta redução de um elétron de oxigênio incluindo ânion superóxido (O_2^\bullet), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (DROGE, 2002). O aumento do nível de EROs geralmente resulta da falta ou perturbação funcional das moléculas antioxidantes ou devido à superprodução de EROs (SOHAL e WEINDRUCH, 1996). Desta forma, vários estudos evidenciaram que o tratamento com antioxidantes de diferentes fontes são capazes de promover uma proteção aos

efeitos desencadeados pela AFB1 em diferentes parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados (EL-AGAMY, 2010; EL-NEKEETY *et al.*, 2011b; RAVINAYAGAM *et al.*, 2012)

Além disso, dentre as diversas proteínas constituintes da membrana neuronal, destaca-se a enzima Na^+ , K^+ -ATPase, que é particularmente sensível ao estresse oxidativo (JAMME *et al.*, 1995b; MOREL *et al.*, 1998). No cérebro, cerca de 50% do ATP ou mais é consumido pela Na^+ , K^+ -ATPase (ERECINSKA e SILVER, 1994), e a atividade desta enzima é essencial para a manutenção do gradiente eletroquímico, modulação dos potenciais de repouso e liberação de neurotransmissores (STAHL e HARRIS, 1986). Desta forma, a Na^+ , K^+ -ATPase, pode ser alvo de neurotransmissores, hormônios e outras substâncias que, agindo diretamente na enzima ou através de suas vias de sinalização intracelulares específicas, podem regular a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, através da fosforilação e resíduos específicos nesta enzima, principalmente na subunidade α (THERIEN e BLOSTEIN, 2000). Ocorre uma significativa correlação entre a inibição desta enzima e os déficits cognitivos em diversos modelos de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson (KONG *et al.*, 2005; BAGH *et al.*, 2008; JOVICIC *et al.*, 2008).

Assim, este estudo teve como objetivo investigar a influência da AFB1 em modelos comportamentais para avaliar atividade locomotora e exploratória, ansiedade, memória e depressão bem como seus efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central através da determinação da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, marcadores bioquímicos de dano oxidativo e imunorreatividade a PKA e PKC após a exposição aguda à aflatoxina B1 em ratos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MICOTOXINAS

Os fungos são organismos eucariotos, aclorofilados, apresentando nutrição absorptiva, reprodução sexuada ou assexuada, com parede celular. Esse grupo de microrganismos tem relevante importância em nossas vidas, e são conhecidos desde a antiguidade, através dos processos de fermentação. Sabe-se que a presença de fungos altera o sabor e a qualidade dos alimentos. Algumas destas alterações são desejáveis, como na fabricação de queijos. Porém, em muitos casos, os fungos por apresentarem uma grande versatilidade em se adaptar a diferentes ambientes, podem causar transformações indesejáveis nos alimentos, produzindo sabores e odores desagradáveis bem como a produção de metabólitos secundários, as micotoxinas, as quais provocam prejuízos para a agricultura, para a indústria de alimentos e para a saúde (MOSS, 1992; DINIZ, 2002; KLICH, 2003).

Para os fungos se desenvolverem e produzirem micotoxinas são necessárias condições favoráveis de umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial redox (PEREIRA, 2002). A presença do fungo no alimento não implica, obrigatoriamente, em produção de micotoxinas, assim como, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo (DINIZ, 2002).

Diferentes espécies de fungos podem produzir um mesmo tipo de micotoxina, como também, uma única espécie de fungo pode produzir mais de um tipo de micotoxina. Os efeitos tóxicos das micotoxinas podem ser potencializados pelo sinergismo que pode haver entre elas ou pela existência de doenças, principalmente as imunossupressoras (HUSSEIN, 2001).

Os diferentes efeitos ocasionados pelas micotoxinas se devem às suas diferenças na estrutura química, as quais são influenciadas pelos organismos animais que as ingerem, pela diversidade de espécies, raça, sexo, idade, fatores ambientais, manejo, condições nutricionais (HAYES, 1986).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana direta ou indiretamente. Diretamente, através do consumo de cereais, oleaginosas e derivados. Os animais que se alimentam com rações previamente contaminadas podem excretar micotoxinas no leite, carne e ovos, e conseqüentemente, constituir-se em fonte de contaminação indireta para os humanos (MOLIN, 1999). As condições climáticas de um país determinam, em grande parte, as classes de fungos que irão crescer e os tipos de micotoxinas que podem produzir. No Brasil, existem condições propícias para o crescimento de todo tipo de fungos produtores de micotoxinas.

A produção de micotoxinas pode ocorrer em diferentes fases do desenvolvimento, maturação, colheita, transporte, processamento e armazenagem dos grãos (GOLDBLATT, 1977; BRERA *et al.*, 1998). Sua entrada no organismo geralmente se dá pela via oral e muitas destas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, frequentemente os mais atingidos são o fígado, os rins e o sistema nervoso central (GONÇALEZ, 2005).

Os efeitos tóxicos induzidos pelas micotoxinas dependem da dose e da frequência com que ela é ingerida, e assim são classificados como agudo (letal ou não), subagudo ou crônico. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado da ingestão de doses menores que provocam distúrbios e alterações no metabolismo humano e animal (BENNETT e KLICH, 2003; MURPHY, 2006; SHEPHARD, 2008).

Os principais gêneros de fungos envolvidos em casos de micotoxicoses são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, mas existem também espécies toxigênicas em outros gêneros (SABINO, 1996). Atualmente são conhecidas mais de quinhentas micotoxinas, produzidas por aproximadamente, uma centena de fungos. As principais micotoxinas podem ser divididas em três grupos: aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, e as fusariotoxinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (MALMANN, 2007).

Dentre centenas de micotoxinas, as aflatoxinas têm recebido grande atenção em comparação com as demais, pois apresentam maior número de resultados positivos em alimentos, podendo provocar efeitos agudos tóxicos em animais e em seres humanos devido ao seu potencial carcinogênico (WOOD, 1992; SCUSSEL, 1998).

2.2 AFLATOXINAS

A descoberta das propriedades hepatotóxicas e hepatocarcinogênicas de algumas linhagens de *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* ocorreu no início da década de 1960, devido ao surto que provocou alta mortalidade em perus, conhecido como “turkey - X disease”. Milhares de aves morreram após o consumo de torta de amendoim acrescentada na ração, proveniente do Brasil. Com a elucidação que o principal fungo encontrado na ração animal foi o *Aspergillus flavus*, foi definido o termo aflatoxina, a partir do nome do seu principal agente

produtor (*Aspergillus flavus* **toxina**), seguidas pela elucidação da estrutura de seus metabólitos tóxicos, e assim iniciaram os estudos com estas toxinas (WOGAN, 1992).

Aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*, sobretudo *A. flavus* e *A. parasiticus*, *A. nomius*, *A. bombycis*, *A. pseudotamari* e *A. ochraceoroseus* que também se mostraram aflatoxigênicas (PETERSON *et al.*, 2001; MOSS, 2002). Além disso, a incidência de aflatoxinas é relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical, onde os fungos têm temperatura e umidade favoráveis para o seu crescimento (MOSS, 1998). A umidade relativa ideal para a produção de aflatoxinas está entre 88 a 95%; a temperatura ótima para crescimento fúngico é de 36 a 38°C e para máxima produção de aflatoxinas de 25 a 27°C (ABBAS *et al.*, 2005). Outros fatores que ainda podem influenciar a produção de aflatoxinas são: linhagem do fungo contaminante, estresse da planta, competição microbiana, danos mecânicos, composição do substrato, pH, teores de oxigênio e dióxido de carbono atmosféricos (GONZALEZ, 2001).

As aflatoxinas são consideradas as micotoxinas de maior importância toxicológica no Brasil, dentre as centenas de micotoxinas conhecidas, por apresentarem efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Alguns compostos já foram descritos como sendo aflatoxinas, mas apenas quatro tipos de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 foram relatados como contaminantes de sementes e alimentos. A aflatoxina B1 geralmente apresenta a maior prevalência em vários produtos agrícolas, e também é a mais tóxica do grupo, sendo produzida junto com a aflatoxina B2 por *A. flavus*, e em quantidades similares o *A. parasiticus* produz as quatro aflatoxinas (MALMANN, 2007).

As aflatoxinas assim como outros compostos heterocíclicos são substâncias fluorescentes e apresentam características próprias, onde as aflatoxinas B1 e B2 emitem uma fluorescência azul, e a letra B é derivada da palavra *Blue* assim como, as aflatoxinas G1 e G2 emitem uma fluorescência verde amarelada sob luz ultravioleta, e a letra G é derivada da palavra *Green* (HUSSEIN e BRASEL, 2001). As aflatoxinas M1 e M2 (derivada da palavra *Milk*) são produzidas pelo fígado após a ingestão de alimentos contaminados, encontrados no leite, carne e são metabólitos das aflatoxinas B1 e B2 (COULOMBE, 1991).

As aflatoxinas são um grupo de micotoxinas relativamente instáveis quando expostas à luz, particularmente à radiação ultravioleta, são compostos de natureza cristalina, termoestáveis, não são afetadas pelo frio, sendo destruídas na presença de amônia, hipoclorito ou soluções fortemente alcalinas. Outro ponto que merece atenção, é que a presença de aflatoxinas nos alimentos, não altera o sabor, cor e o aroma dos mesmos (BORETTI, 1998).

A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, sendo que todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide. São compostos químicos simples e de baixo peso molecular. As aflatoxinas do grupo B apresentam anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona (HUSSEIN e BRASEL, 2001). A série B das aflatoxinas é quimicamente diferente da série G pela presença do anel ciclopentenona no lugar de um anel 3-lactona. Nas aflatoxinas B1 e G1 é encontrada uma dupla ligação 8,9 na forma de um éter vinil no anel terminal furano, mas não são encontradas nas aflatoxinas B₂ e G₂ (JAIMEZ *et al.*, 2000). Apesar da semelhança química entre as aflatoxinas, elas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A aflatoxina B1 é a que apresenta maior toxicidade, seguida pelas aflatoxinas G1, B2 e G2 (COULOMBE, 1991).

A preocupação relacionada aos impactos causados pelas aflatoxinas na saúde se tornou objeto de vários estudos, para que se estabelecessem medidas para prevenir sua formação em alimentos, da mesma forma que eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade destas toxinas em produtos já contaminados (HERNANDEZ-MENDOZA *et al.*, 2009). Métodos de melhoria das práticas agrícolas, utilização de agentes antifúngicos adequados, engenharia genética e controle das condições de armazenamento dos grãos e cereais, principalmente temperatura e umidade são algumas alternativas de controle (GONZALEZ, 2001).

Além disso, a legislação Brasileira apresenta limites máximos para a presença de aflatoxinas em alimentos. A resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) nº 7, de 18 de fevereiro de 2011, dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para aflatoxinas (AFB1+AFB2+AFG1+AFG2 e AFM1), ocratoxina A (OTA), desoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB1 + FB2), patulina (PAT) e zearalenona (ZON) admissíveis em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas, com valores expressos para cada alimento. Na tabela 1 é disposto o limite permitido para aflatoxinas em diferentes matrizes alimentícias (BRASIL, 2011).

Tabela 1 – Limites máximos tolerados (LMT) de concentração de aflatoxinas no Brasil em diferentes alimentos.

| Micotoxinas | Alimento | LMT (µg/kg) |
|---------------------------------------|--|------------------------|
| Aflatoxina M1 | Leite fluído | 0.5 |
| | Leite em pó | 5 |
| | Queijos | 2.5 |
| Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 | Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada | 5 |
| | Feijão | 5 |
| | Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistaches, avelãs e amêndoas | 10 |
| | Frutas desidratadas e secas | 10 |
| | Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto | 20 |
| | Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto | 10 |
| | Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior | 15 |
| | Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância) | 1 |
| | Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância | 1 |
| | Amêndoas de cacau | 10 |
| | Produtos de cacau e chocolate | 5 |
| | Especiarias: <i>Capsicum spp.</i> (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); <i>Piper spp.</i> (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta); <i>Myristica fragrans</i> (noz-moscada); <i>Zingiber officinale</i> (gingibre); <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas | 20 |
| | Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim | 20 |
| | Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho | 20 |

Fonte: Adaptado da resolução da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) nº 7, de 18 de fevereiro de 2011.

2.2.1 Metabolismo das aflatoxinas

As aflatoxinas são rapidamente absorvidas pela sua alta lipossolubilidade e são lentamente excretadas. As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal por difusão

passiva, difundindo-se rapidamente por todo o organismo de maneira que três horas após a alimentação, podemos encontrar as aflatoxinas B1 e B2 em todos os tecidos (SHARMA, 1991; MELLO, 1999). Ao ser absorvida a aflatoxina B1 é imediatamente ligada de forma reversível à albumina e também em menor escala a outras proteínas. As formas ligadas e não ligadas da aflatoxina B1 a proteínas séricas distribuem-se pelos tecidos, principalmente no fígado (WYATT, 1991). São biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microsossomais do sistema de funções oxidases mistas (CYP), pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P-450 (BIEHL, 1987), que constituem parte do processo de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo (FORRESTER, 1990). A forma ativa da aflatoxina B₁ é o metabólito 8,9-epóxido de aflatoxina B1, anteriormente denominado AFB1 - 2,3 - epóxido, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bi-furanóide da molécula de aflatoxina B1 (BIEHL, 1987). Este composto, altamente eletrofílico, é capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como do ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. Estas ligações determinam à formação de aductos, os quais são responsáveis pela lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (OLIVEIRA, 1997).

O metabólito 8,9-epóxido da aflatoxina B1 também pode sofrer uma conjugação enzimática com uma molécula de glutathiona reduzida, através de glutathiona-S-transferases, constituindo uma importante via de detoxificação deste composto, podendo ser excretado na urina, bile e fezes (ESSIGMANN, 1982). Esta ligação do 8,9-epóxido da aflatoxina com o DNA modifica a sua estrutura, e por isso a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da aflatoxina B1. A formação de aductos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53 (HSIEH, 1991). A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático (BRESSAC, 1991; HARRIS, 1991; OZTURK, 1991; PUISIEUX *et al.*, 1991).

Estudos em fígados de ratos demonstraram que os aductos AFB1- N7-guanina podem ser retirados após a sua formação, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA (HSIEH e ATKINSON, 1991). Os sítios vagos tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, o que origina um ponto de mutação bastante significativo (AGUILAR *et al.*, 1993). Os aductos de DNA, depois de sofrerem depurinação espontânea, podem ser conjugados e excretados, sobretudo através da urina (GROOPMAN *et al.*, 1992).

A biotransformação da aflatoxina B₁ inclui, além da epoxidação, as reações de hidroxilação e de O-desmetilação. Na reação de hidroxilação são formadas as aflatoxinas M₁ (AFM₁), aflatoxina Q₁ (AFQ₁) e a aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}), enquanto que a aflatoxina P₁ (AFP₁) é formada na reação de O-desmetilação. Esses quatro novos compostos possuem o grupo hidroxila em sua molécula, permitindo a sua conjugação com o ácido glicurônico ou sulfatos, tornando-as substâncias bastante solúveis em água. Essas substâncias podem então ser excretadas através da urina, bile e fezes (BIEHL, 1987).

As vias de biotransformação da aflatoxina B₁ mudam entre as espécies animais, tal evento poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à aflatoxina B₁ entre os indivíduos (WOGAN, 1992). Existe um consenso entre grande número de especialistas, de que a aflatoxina B₁ é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (BIEHL, 1987; HSIEH, 1991; WOGAN, 1992).

Devido às reações ocorridas entre a aflatoxina B₁ com o DNA, RNA e proteínas, a transição de enzimas e formação de algumas destas conduz a graves conseqüências para o organismo por comprometer o metabolismo energético, produção de anticorpos e mobilização de gordura (BEER, 1991). Os efeitos citotóxicos da aflatoxina B₁ ocorrem devido à formação de radicais livres dentro dos hepatócitos resultando na peroxidação dos fosfolípídeos e consequente aumento na permeabilidade das membranas plasmática, mitocondrial, do retículo endoplasmático e dos lisossomos, diminuindo a fluidez, inativando completamente as proteínas de membrana e despolarização da membrana mitocondrial (BISCHOF, 2007).

2.2.2 Toxicidade das aflatoxinas

Dependendo da concentração de aflatoxina nos alimentos, o tempo de ingestão e o tipo da aflatoxina são observados diferentes sinais e sintomas. A grande maioria dos animais expostos a esta micotoxina mostram sinais da doença que vão de agudos (letais ou não letais), subagudos e crônicos. Os primeiros sinais clínicos se apresentam em poucas horas a uma semana sendo eles: hepatite, hemorragia, nefrite e enterite seguida de morte (MALMANN, 2007). Os efeitos subagudos provocam alterações e distúrbios nos órgãos dos animais e dos homens, principalmente no fígado, sendo resultado da ingestão de doses menos elevadas por períodos maiores (TEIXEIRA, 2008). Já, os efeitos crônicos são manifestações decorrentes da ingestão de baixas doses de aflatoxinas por um período prolongado. Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens, sendo observados os efeitos de imunossupressão, redução da contagem de linfócitos T, diminuição

da produção de imunoglobulinas, diminuição da fagocitose e a diminuição da resistência (LEESON, 1995). Também podemos observar a diminuição da eficiência reprodutiva, piora da conversão alimentar, taxa de crescimento e ganho de peso (MALMANN, 2007), sendo que em qualquer um dos casos, o aparecimento dos sintomas e sua gravidade dependem da espécie animal, idade, estado nutricional e do sexo.

Entre as espécies animais a sensibilidade aos efeitos das aflatoxinas é variável. A relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade, composição da dieta, entre outros fatores, mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (COULOMBE, 1991). Para várias espécies, os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas e em geral a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (LEESON, 1995).

Entretanto, considerando todos estes fatores, o efeito de toxicidade crônico mais importante das aflatoxinas é representado pela carcinogênese hepática em várias espécies animais, (peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas). Nestes animais, mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas a aflatoxina B1 induz à formação de carcinoma hepatocelular, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais (COULOMBE, 1991). A dose efetiva de AFB1 ingerida para a indução de tumores hepáticos varia amplamente entre as espécies, de modo similar ao que ocorre em relação à toxicidade aguda. Peixes e aves são extremamente sensíveis, e a dose efetiva para a indução de hepatomas situa-se entre 10 e 30 µg/kg de aflatoxina B1 na dieta. Contudo, a sensibilidade é particularmente variável entre roedores, sendo que os ratos respondem nos níveis de 15 a 1.000 µg/kg de aflatoxina B1 na dieta, enquanto que certas cepas de camundongos não apresentam nenhuma resposta em doses de até 150.000 µg/kg de AFB1 (WOGAN *et al.*, 1971).

Os valores da DT_{50} apresentados na tabela 2 refletem, entre outros fatores ³² diferenças intra e interespecies observadas na biotransformação da aflatoxina B1, particularmente em relação aos mecanismos de bioativação e detoxificação. Por exemplo, a habilidade de ativar a aflatoxina B1, para a formação do epóxido, é mais eficiente em preparações enzimáticas de fígado de ratos, do que de primatas, incluindo o homem; por outro lado, observa-se o oposto em relação à capacidade de formação de derivados hidrossolúveis e a consequente detoxificação da AFB1 (MASSEY, 1995).

Tabela 2 – Valores da dose média para a produção de tumores (DT₅₀) após ingestão prolongada da Aflatoxina B1 na dieta, para diversos animais.

| Animal | DT₅₀ (µg/ kg p.c./dia) |
|--------------------------------------|--|
| Rato <i>Fisher</i> Macho | 1.3 |
| Rato <i>Fisher</i> Fêmea | 7.5 |
| Rato <i>Wistar</i> Macho | 5.8 |
| Rato <i>Wistar</i> Fêmea | 6.9 |
| Rato <i>Porton</i> Macho | 3.1 |
| Rato <i>Porton</i> Fêmea | 12.5 |
| Camundongo <i>C3H</i> Macho | >70 |
| Camundongo <i>C57B</i> Macho | >70 |
| Camundongo <i>Swiss</i> Macho | >5.300* |
| Macaco <i>Rhesus</i> | 156 |
| Macaco <i>Cynomolgus</i> | 848 |

NOTA: *Valor baseado no maior nível de AFB1 administrado aos animais, para o qual não foram observados tumores no fígado ou em outros órgãos.

FONTE: Adaptado de MASSEY et al., 1995.

Além dos efeitos hepatocarcinogênicos, está comprovada a relação entre a ingestão de aflatoxina B1 com a incidência da hepatite B e do “*Kwashiorkor*”, que é uma condição causada por uma carência proteica ou de outros nutrientes, cujos sintomas são letargia, retardamento mental, anemia, despigmentação da pele, perda ou descoloração do cabelo, que mata milhões de crianças nos países subdesenvolvidos (BURGUEIRA, 1986; WONG, 1998). Pesquisadores têm sugerido que o desenvolvimento da “*Kwashiorkor*” pode ser resultado da intoxicação aguda por aflatoxinas, e que os efeitos dependem da frequência e da quantidade de ingestão de produtos contaminados com elas (TEIXEIRA, 2008).

Também foram investigados em cobaias de laboratório os principais efeitos teratogênicos da aflatoxina B1 e consistiram em número reduzido de nascidos vivos, baixo peso médio dos nascidos vivos, atraso no desenvolvimento físico, alterações de desempenho neurocomportamental e coordenação motora prejudicada (KIHARA *et al.*, 2000). Na literatura há relatos da indução da fenda palatina, malformação do esqueleto e do sistema nervoso central, retardamento do crescimento intra-uterino, carcinogênese transplacentar em ratos e imunossupressão seletiva em embriões de pintos (WILD, 2002).

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO E AFLATOXINAS

Os radicais livres nos quais os elétrons desemparelhados encontram-se centrados no átomo de oxigênio são identificados como espécies reativas de oxigênio (ERO), e as

principais são o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) (HALLIWELL, 1999)(figura 1). Em condições normais, os radicais livres são continuamente produzidos e neutralizados pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. Porém, quando estes radicais livres são produzidos em altas quantidades, ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, eles podem causar dano celular, representando um mecanismo fundamental para as doenças ou efeitos nocivos em seres humanos, denominado “estresse oxidativo” (HALLIWELL, 1999).

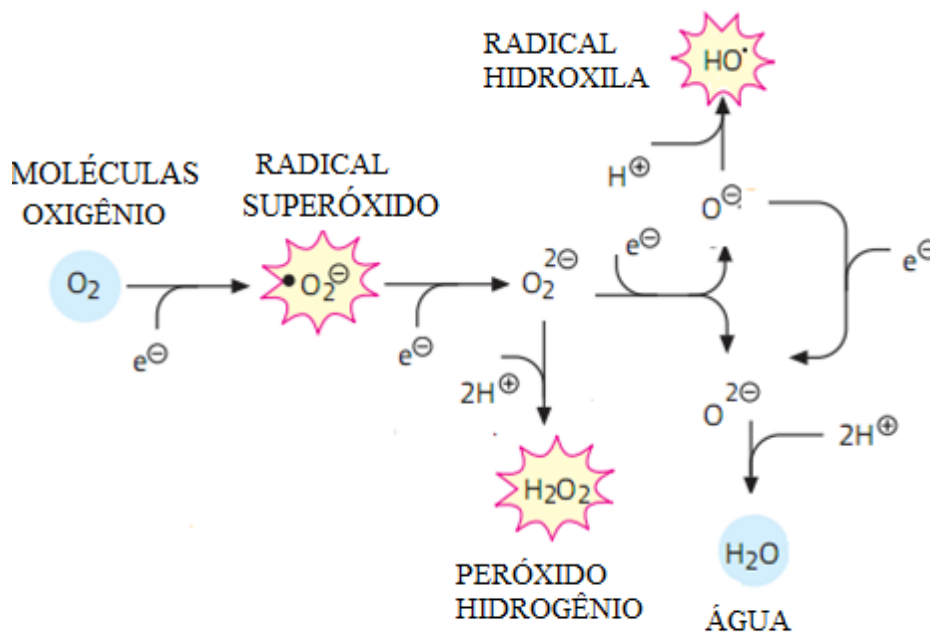


Figura 1 – Representação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Fonte: Adaptado de Koolman, 2005.

Vários estudos mostram a participação do estresse oxidativo nos efeitos tóxicos induzidos pela aflatoxina B1, e atribuem a este fato a hepatotoxicidade característica induzida por esta micotoxina. Sugere-se que os efeitos tóxicos são mediados pelo aumento da produção de espécies reativas como o ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio durante o metabolismo hepático da micotoxina (TOWNER *et al.*, 2003a).

Um estudo de (EL-NEKEETY *et al.*, 2011a) mostrou que o consumo de dieta contendo aflatoxina (2.5 mg/kg, 29 dias) por ratos Sprague-Dawley aumentou a atividade da aspartato aminotransferase (AST), alanina transaminase (ALT), fosfatase alcalina (FAL), colesterol, triglicérides, lipídeos totais, creatinina, ácido úrico e óxido nítrico e reduziu os níveis da TAC (capacidade antioxidante total), sendo que nos tecidos hepático e renal

aumentou os níveis de MDA (malonaldeído). O tratamento dos animais com o antioxidante *Thymus vulgaris* mostrou hepatoproteção, melhorando todos os parâmetros analisados (EL-NEKEETY *et al.*, 2011a).

Já Verma & Mathuria usaram em seu experimento camundongos Swiss albinos machos que receberam a administração de aflatoxina por 45 dias, mostrando aumento dos níveis de MDA e redução da atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona, glutatona peroxidase (GPx) e bem como do conteúdo de ácido ascórbico (ácido ascórbico) nos tecidos hepático e renal. Além disso, o antioxidante curcumina protegeu dos efeitos causados pela aflatoxina (VERMA e MATHURIA, 2008).

O mesmo antioxidante (curcumina) também apresentou efeitos hepáticos benéficos no trabalho de El-Agamy (2010), que também utilizou o resveratrol como antioxidante, mas este não reverteu o dano causado pela aflatoxina B₁. A administração por 90 dias de aflatoxina B₁ em ratos machos *Fischer* albinos, aumentou os níveis plasmáticos da AST, ALT e gamma-glutamyl transaminase (γ -GT), juntamente com a redução da atividade de enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx, e aumento dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no fígado dos animais. Da mesma forma, Ravinayagam *et al.* (2012) mostrou que a administração de aflatoxina B₁ (2 mg/kg, i.p., 45 dias) aumentou os níveis de MDA, peroxidação lipídica e proteínas carbonil no fígado e nos rins, e reduziu a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, bem como os níveis de glutatona, grupos tióis e vitamina E e C, e o antioxidante Tridham (300 mg/kg; v.o.) reverteu estas alterações (EL-AGMY, 2010; RAVINAYAGAM *et al.*, 2012).

Além disso, a administração de aflatoxina B₁ (450 μ g, i.p./ 2x semana /6 semanas) a ratos *Wistar* machos reduziu a atividade das enzimas CAT, SOD, glutatona-S-transferase (GST), GPx e glutatona redutase (GR) e aumentou os níveis de TBARS no fígado. A administração de clorofila e leite fermentado com probióticos normalizou as atividades enzimáticas e os níveis de TBARS (KUMAR *et al.*, 2012). O efeito antioxidante da *Urtica dioica L.* (2 mL/kg, por v.o./90 dias) em ratos *Sprague Dawley* também foi evidenciado após a administração de aflatoxina B₁ (25 μ g/kg, por v.o./90 dias) no fígado, rins e eritrócitos. O antioxidante reverteu à redução da atividade das enzimas GR, CAT, SOD e GST, e o aumento do MDA, AST, ALT e γ -GT (YENER *et al.*, 2009). No mesmo estudo, também foram investigados os efeitos da AFB₁ no cérebro dos animais, onde houve redução da atividade das enzimas antioxidantes e reversão com o uso da planta, mostrando efeito neurotóxico da AFB₁ e neuroprotetor da *Urtica dioica L.* O possível efeito neurotóxico da AFB₁ também foi sugerido por Murat K. *et al.*, (2011), que demonstrou que houve um aumento nos níveis de

MDA e da atividade da CAT em cérebro, justificando este aumento pela indução do sistema de defesa antioxidante resultando em aumento da síntese enzimática para a eliminação dos radicais livres induzidos pela exposição a toxina (BARJA, 2004; MURAT *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos utilizando machos também são observados quando se pesquisam os efeitos da administração de aflatoxina em fêmeas. Fêmeas *Sprague Dawley* administradas com aflatoxina B1 (3 mg/kg, v.o./29 dias) apresentaram aumento da atividade da AST, ALT, FAL, colesterol, triglicerídeos, lipídios totais, ácido úrico e creatinina, e dos níveis de TBARS no fígado e rim, bem como uma redução da capacidade antioxidante total (TAC). E, de forma semelhante, a adição dos antioxidantes *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus reuteri* mostram uma melhora nos níveis destes marcadores (HATHOUT *et al.*, 2011).

Assim, a partir de um balanço entre as defesas antioxidantes e a geração das EROs, os seres vivos conseguem manter o metabolismo e o funcionamento celular inalterados. Porém, em situações específicas, como após a exposição à aflatoxina B1 este panorama pode ser comprometido através do excesso de produção de EROs e/ou falha das defesas antioxidantes, gerando o estresse oxidativo.

2.4 NEUROTOXICIDADE E AFLATOXINA

Poucos estudos investigam os efeitos da AFB1 sobre o sistema nervoso central, desta forma há a necessidade de se estudar se ela interfere na neurotransmissão e/ou com algum sistema de neurotransmissores/receptores específico, e assim altere o comportamento animal. Neste sentido, sabe-se que esta micotoxina causa uma alteração no metabolismo do triptofano no cérebro, o que diminui as concentrações de serotonina (KIMBROUGH *et al.*, 1992b).

A serotonina é sintetizada a partir do triptofano, e armazenada em vários sítios do corpo. Possui múltiplos papéis fisiológicos, incluindo percepção da dor, comportamento normal e anormal, distúrbios afetivos e regulação do sono. A função da serotonina no desenvolvimento do sistema nervoso central é mediada principalmente pelos receptores 5-HT1A e 5-HT2A (AZMITIA, 2001).

O receptor 5-HT1A, localizado tanto em sítios pré-sinápticos como em pós-sinápticos, possui alta afinidade para serotonina, e desempenha importantes funções na regulação neuroendócrina e térmica, em comportamentos como alimentar, sexual, na função imune, estabelecimento de memória, controle da depressão e ansiedade (BARNES, 1999; ADELL, 2002; DEBSKI, 2002). A serotonina tem sido implicada na regulação de atividades que regem o comportamento (JACOBS, 1999) incluindo o ritmo circadiano (MORIN, 1999), sono/vigília

(LEONARD, 1996) e fenômenos cognitivos, como aprendizado e memória (MCNAMARA, 1993).

Manipulações experimentais dos níveis de serotonina causam alterações na frequência alimentar (BLUNDELL, 1992) ao modular negativamente no hipotálamo a ação de mensageiros reguladores do apetite como as leptinas e o neuropeptídeo Y (MEGUID, 2000).

Também foi observado que além da diminuição dos níveis de serotonina em ratos expostos à aflatoxina B1, foi apontada uma redução dos neurotransmissores norepinefrina (NE) e dopamina (DA). Foi demonstrado que a aflatoxina B1 reduziu em 37% a dopamina estriatal e 29% a serotonina, além disso, essa redução também foi observada nos metabólitos da dopamina (ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC)). As concentrações destes neurotransmissores e metabólitos foram pouco alteradas no córtex cerebral, cerebelo, hipotálamo e medula oblonga. Por isso parece que o maior efeito da aflatoxina é sobre vias dopaminérgicas, podendo perturbar a seletividade da conversão da tirosina para catecolaminas (COULOMBE, R. A. e SHARMA, R. P., 1985). Desta forma, estas alterações nos níveis dos neurotransmissores podem acarretar alterações no comportamento dos animais, que podem ser imperceptíveis se não forem bem avaliadas.

As proteínas quinases (PK) são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP, para resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr) e serina (Ser), compõem a maior família de proteínas nos seres eucariontes e são um componente fundamental da cascata de “comunicação” que ocorre no controle intracelular, na regulação e transdução de sinais (BRIDGES, A.J., 2001; GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C., 2003; ENGH, R.A.; BOSSEMEYER, D., 2001).

A adição e remoção de grupos fosfato são mecanismos fisiológicos importantes na regulação de proteínas intracelulares, as quais podem ser enzimas, receptores ou segundos mensageiros. Uma série de respostas celulares mediadas por receptores e vias metabólicas podem ser ativadas e desativadas pelas quinases (que adicionam grupos fosfato) ou fosfatases (enzimas que removem grupos fosfato) intracelulares. As quinases e as fosfatases, por sua vez, são reguladas por sinais bioquímicos extrínsecos, tais como hormônios e fatores de crescimento (GRIFFIN, J. E.; OJEDA S. R., 1992 e DEVLIN, T.M., 1992).

As proteínas quinases estão associadas a algumas doenças como a asma, o câncer, enfermidades de ordem cardiovascular, diabetes e doenças do sistema nervoso central. Em função de seu papel essencial no processo de proliferação celular, metabolismo do glicogênio, apoptose, neurotransmissão, oncogênese (DEVLIN, T.M., 1992 e COBB, M.H. P., 1999).

A proteína quinase A (PKA) altera as atividades das proteínas-alvo, fosforilando grupos específicos de serina e, em menor quantidade, a treonina, é ativada por concentrações de AMP cíclico (AMPC). A fosforilação destas enzimas pode resultar em alterações das atividades enzimáticas como é o caso da fosforilação do hormônio lípase sensível (HSL), colesterol esterase ou glicogênio fosforilase resultando na ativação enzimática. A ativação da PKA é determinada pelo fenótipo celular e pela disponibilidade de enzimas e substratos que participam desta regulação. A exemplo, a maior resposta do fígado frente ao aumento do AMP é a glicogenólise, uma vez que os hepatócitos expressam enzimas que sintetizam e metabolizam o glicogênio (GRIFFIN, J. E.; OJEDA S. R., 1992; LEHNINGER *et al.*, 2000).

A proteína quinase C (PKC) PKC também é alvo de fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante sua translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação do citosol à membrana plasmática ocorre em resposta a um aumento transitório de diacilglicerol, ou exposição a agentes exógenos, conhecidos como forbol-ésteres (GRIFFIN, J. E.; OJEDA S. R., 1992; ADAMS J.A., 2001; IBRAHIMI, O.A. *et al.*, 2004). A ativação da PKC está associada com processos de regulação em diferentes compartimentos subcelulares e acredita-se também influenciar processos importantes da fisiologia neuronal (Miller, 1986). Sendo que, em outros estudos já foi visto que a PKC serve como um receptor para os promotores de tumor, e assim cria condições favoráveis para a carcinogênese (Nishizuka, 1984; Mistry et ai, 2001).

Neste contexto, considerando que a exposição à aflatoxina altera os níveis dos neurotransmissores serotonina, norepinefrina e dopamina, considerando as importantes funções fisiológicas e comportamentais que estes neurotransmissores possuem, bem como seu efeito já visto sobre a PKC, torna-se relevante o estudo das possíveis alterações comportamentais observadas após a exposição a AFB1 em ratos.

2.5 AVALIAÇÃO DE ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS

Embora a expressão emocional varie de uma espécie para outra, comportamentos emocionais, como esquiva e imobilidade, permanecem a mesma e constituem a base para a classificação das emoções ao longo da evolução biológica. Com base nisso, emoções básicas, tais como medo e expectativa, são representadas por redes neurais inatas que coordenam as estratégias comportamentais permitindo aos animais interagirem com mudanças contínuas no ambiente (ZANGROSSI e POBBE, 2003). No presente trabalho nós investigamos se a

exposição aguda a AFB1 altera o comportamento dos animais em testes de memória, ansiedade e depressão e locomoção.

2.5.1 Memória

O aprendizado e a memória são funções essenciais no sistema nervoso central (SNC), no entanto, apresentam processos distintos. O aprendizado pode ser definido como uma alteração relativamente permanente no comportamento que ocorre em consequência da prática ou da experiência, já a memória consiste na capacidade de armazenar ou evocar informações (LENT, 2002; SQUIREL, 2003).

Para que ocorra a formação da memória deve haver inicialmente a aquisição da informação, que consiste na entrada de um evento qualquer nos sistemas neuronais ligados a memória. De acordo com o tipo de informação ela pode ser esquecida imediatamente, memorizada por um curto período, ou retida por períodos prolongados, caracterizada pelo processo de consolidação. Por fim ocorre a evocação, processo onde a informação armazenada pode ser requisitada para uso na cognição, emoção e/ou expressão de um comportamento (IZQUIERDO, 2002).

As memórias podem ser classificadas de acordo com o tempo de retenção da informação armazenada em: memória imediata ou sensorial com duração muito curta, apenas alguns segundos; memória de curta duração, podendo esta durar minutos ou poucas horas; e memória de longa duração, que pode durar horas, dias ou anos garantindo o registro do passado e conhecimentos do indivíduo (IZQUIERDO I., 2000; SQUIREL, 2003).

Embora os mecanismos envolvidos nos processos de formação da memória não estejam completamente estabelecidos, há diversos trabalhos na literatura que sugerem a participação de uma série de alterações bioquímicas em diferentes áreas do SNC. Eventos bioquímicos incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos e mudanças em segundos mensageiros com ativação de proteínas quinases (IZQUIERDO I, 1997; IZQUIERDO, 2002).

Estudos demonstram o envolvimento das proteínas quinase nos processos de aprendizagem e memória (BERNABEU *et al.*, 1997; IZQUIERDO e MEDINA, 1997; VIANNA *et al.*, 2000; QUEVEDO *et al.*, 2004). A proteína quinase C (PKC) é uma enzima monomérica, ou seja um único polipeptídeo simples formado por um domínio regulatório e um domínio catalítico (NEWTON, 2003; AMADIO *et al.*, 2006; SUN e ALKON, 2010). Foi

visto que a atividade hipocampal da PKC aumenta imediatamente depois do treino na tarefa de esquivar inibitória atinge um pico 30 minutos mais tarde retornando aos níveis normais 120 minutos depois do treino (BERNABEU *et al.*, 1995; CAMMAROTA *et al.*, 1997). Além disso, alguns estudos relatam uma relação entre a PKC e a proteína quinase A (PKA) (SUGITA *et al.*, 1997; KUBOTA, 2003; YAO, 2008) nos processos de formação e consolidação da memória.

A PKA é uma haloenzima tetramérica formada por duas subunidades R e duas subunidades C. A PKA atua aumentando a síntese proteica, tornando de grande relevância na fase final de consolidação da memória, a qual necessita da síntese de proteínas (ELIOT, 1989; DASH *et al.*, 1991; CHETKOVICH e SWEATT, 1993; MAYFORD *et al.*, 1995; IMPEY *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2001; QUEVEDO *et al.*, 2005). Assim, decidimos determinar a imunorreatividade destas proteínas quinase após a exposição à AFB1.

Além da participação das proteínas quinase, tem sido proposto também o envolvimento da enzima Na^+, K^+ -ATPase (SATO *et al.*, 2004; WYSE *et al.*, 2004) e do estresse oxidativo (ABIDIN *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2004) na modulação dos processos cognitivos. Desta forma, sabendo que a aflatoxina B1 interfere nos níveis de neurotransmissores, e do papel fundamental destes transmissores nos processos cognitivos, objetivamos avaliar se a exposição aguda a aflatoxina B1 pode também modificar os processos de aprendizado e memória.

2.5.2 Ansiedade e medo

A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e de provável ocorrência. Medo, no entanto, pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real e bem definida, e é visto por vários autores como entidade independente da ansiedade. Ainda assim, por vezes pode ser difícil uma separação entre as duas (RAMOS e MORMEDE, 1998).

Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco (“risk assessment”), o que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos (BLANCHARD *et al.*, 2001). Desta forma, pretendemos

avaliar se após a exposição aguda à AFB1 os animais apresentam algum parâmetro comportamental de ansiedade alterado no teste do labirinto em cruz elevado.

2.5.3 Depressão

A depressão é um transtorno mental grave que é cada vez mais comum na população. A elucidação dos mecanismos neurobiológicos e psicopatológicos subjacentes à doença é necessária para um melhor tratamento das pessoas. O comportamento e a cognição podem ser afetados assim como, o humor e os sentimentos. A depressão manifesta-se em, em alguns indivíduos com redução do pensamento e do movimento. Em alguns pacientes, esquecimentos e dificuldades de concentração são manifestações proeminentes. Outros apresentam agitação e, até mesmo experiências psicóticas, quando este distúrbio encontra-se em estágios graves (CECIL., 2005)

As principais teorias relativas à base biológica da depressão situam-se nos estudos sobre neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora outras áreas também estejam sob investigação. As monoaminas constituem-se na principal hipótese envolvendo os neurotransmissores cerebrais. Subdividem-se em catecolaminas: dopamina (DA) e noradrenalina (NE), e na indolamina: serotonina (5HT).

Considerando que a exposição à aflatoxina altera os níveis dos neurotransmissores serotonina, norepinefrina e dopamina, e, considerando as importantes funções fisiológicas e comportamentais que estes neurotransmissores possuem, torna-se relevante o estudo das possíveis alterações comportamentais após a exposição à AFB1 nos testes de avaliação de depressão como nado forçado e teste de preferência por sacarose.

2.5.4 Atividade locomotora e exploratória

O teste do campo aberto é uma avaliação simples, da reatividade emocional comumente utilizada para determinar a atividade geral, atividade locomotora e hábitos de exploração em roedores em estudos de toxicologia do desenvolvimento (HALL, 1934). Também é uma ferramenta usada para avaliar ansiedade e memória em testes distintos. O aparato consiste de uma arena circular, com o chão dividido em quadrantes iguais, onde além do número de cruzamentos e respostas de levantar, também podemos avaliar o tempo que o animal permanece no centro ou na periferia da arena. Neste estudo verificamos se a exposição

aguda a AFB1 altera o comportamento locomotor e exploratório, bem como o tempo que o animal fica no centro da arena, como parâmetro de ansiedade.

2.6 Na^+, K^+ -ATPASE

A Na^+, K^+ -ATPase também conhecida como bomba de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ é uma proteína transmembrana responsável pela manutenção do gradiente iônico neuronal, através do transporte ativo de três íons de Na^+ para meio extracelular e dois íons K^+ para meio intracelular, concomitante hidrólise de aproximadamente 50 % do ATP produzido no cérebro (AMES, 2000; ERECINSKA *et al.*, 2004). Além de funcionar como uma bomba iônica, a Na^+, K^+ -ATPase pode atuar como um receptor para ouabaína nos eventos de transdução de sinal (LIU *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004).

A Na^+, K^+ -ATPase é um heterodímero composto por uma subunidade α e uma subunidade β , que pode estar co-localizada em uma proteína da família FXYD denominada alternativamente de subunidade γ (KAPLAN, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2003). As diferentes combinações entre as subunidades α e β formam uma variedade de isoformas de Na^+, K^+ -ATPase que são expressas em diferentes células e tecidos específicos (KAPLAN, 2002; JORGENSEN *et al.*, 2003). Já foram descritas três isoformas de Na^+, K^+ -ATPase no cérebro. A isoforma $\alpha 1$ é encontrada em muitos tipos de células, a $\alpha 2$ predominantemente encontrada na glia e células piramidais do hipocampo e a isoforma $\alpha 3$ expressa somente em neurônios (MOSELEY *et al.*, 2007).

Já foi demonstrada uma associação entre a diminuição da atividade dessa enzima e a fisiopatologia de diversas doenças que afetam sistema nervoso central, entre elas as doenças degenerativas e as desordens depressivas (WYSE *et al.*, 2000; YU, 2003; GOLDSTEIN *et al.*, 2006; VIGNINI *et al.*, 2007).

Considerando que a Na^+, K^+ -ATPase é importante para funções celulares e sinápticas, a inibição da atividade desta enzima pode ocasionar prejuízos no funcionamento normal do sistema nervoso central (SNC) (LEES *et al.*, 1990a), é importante verificar a atividade desta enzima após a exposição aguda à aflatoxina B1.

2.7 CONTAMINANTES DE ALIMENTOS E PROBLEMAS DE SAÚDE

Várias mudanças nos hábitos alimentares têm sido observadas nas últimas décadas em muitos países, desta forma a população se expõe a diferentes tipos de contaminantes alimentares. A quantidade e o tipo de contaminante ou produto químico podem causar diversos prejuízos à saúde. Alguns contaminantes presentes nos alimentos têm sido relacionados com alterações comportamentais, cancerígenas ou mutagênicas em modelos experimentais. A exposição pode ocorrer por via exógena, quando estes agentes estão presentes nos alimentos, no ar ou na água, e também de forma endógena, quando eles são produtos do nosso próprio metabolismo (PASCUAL-TERESA., 2014; PLANAS. VILÀ. M, 2014; WAGNER, 2015).

Além disso, cabe ressaltar que as micotoxinas são compostos estáveis as operações de processamento e cozimento dos alimentos, então uma vez contaminado, o alimento estará permanentemente com a micotoxina, e assim não temos como evitar a nossa exposição. Apesar das diferenças nos níveis de contaminação, a exposição à micotoxinas é aparente em todos os continentes, mas o impacto sobre a saúde na maioria casos permanece pouco examinado e exige um esforço de investigação significativo.

Neste sentido alguns epidemiologistas já alertaram que a exposição humana as micotoxinas é inevitável, pois todos nós consumimos grande quantidade e variedade de cereais, e se estes estiverem contaminados, tem a capacidade de afetar negativamente nossa saúde e nos deixar mais susceptíveis a diversas doenças. Nefropatia, vários tipos de câncer, leucopenia alimentar tóxica, doenças hepáticas, várias síndromes hemorrágicas, distúrbios imunológicos e neurológicos são as doenças mais comuns que podem ser relacionados com micotoxicoses (TURNER, 2012; WAGNER, 2015).

Diante do exposto acima, considerando que estamos expostos diariamente a contaminantes presentes nos alimentos, neste trabalho nós investigamos se uma única exposição à estes contaminantes, especificamente a AFB1, pode trazer alguma modificação no nosso comportamento. O presente trabalho investigou os efeitos da administração aguda desta micotoxina em testes de aprendizado e memória, locomoção, ansiedade e depressão bem como seus efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central através da determinação da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase e marcadores bioquímicos de dano oxidativo e imunorreatividade da PKA(Ser96) e PKC(Ser957), 48h após a exposição.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos da exposição aguda à AFB1 sobre alterações comportamentais, atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase juntamente com marcadores de dano oxidativo e imunorreatividade das proteínas quinase A e C no córtex cerebral 48 horas após a exposição.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Determinar se a exposição aguda à AFB1 altera o comportamento motor e exploratório no teste do campo aberto;

2 - Determinar se a exposição aguda à AFB1 afeta a ansiedade dos animais no teste do labirinto em cruz elevado e no teste do campo aberto;

3 - Determinar se a exposição aguda à AFB1 interfere na capacidade de aprendizado e memória dos animais, através de parâmetros quantificados no teste de reconhecimento e localização de objetos;

4 - Determinar se a exposição aguda à AFB1 induz comportamento tipo depressivo, através do teste de nado forçado e do teste de preferência por sacarose;

5 - Determinar se a exposição aguda à AFB1 altera a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase no córtex cerebral

6 - Determinar o efeito da exposição aguda à AFB1 sobre marcadores de estresse oxidativo no córtex cerebral (ácido ascórbico, tióis não proteicos, peroxidação lipídica, atividade da SOD e GST, carbonilação proteica e níveis de 3-nitrotirosina).

7 - Determinar se a exposição aguda à AFB1 altera a imunorreatividade da proteína quinase A (PKA-Ser96) e proteína quinase C (PKC-Ser957) no córtex cerebral.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of Aflatoxin B1 on oxidative stress markers and PKC immunoreactivity on the cerebral cortex of young rats after behavioral tests

Naiéli Schiefelbein Souto^a, Ana Cláudia Monteiro Braga^b, Leandro Rodrigo Ribeiro^c,
Mayara Lutchemeyer de Freitas^b, Michele Rechia Fighera^{b,d},
Luiz Fernando Freire Royes^{b,d}, Mauro Schneider Oliveira^{b,d} Ana Flávia Furian^{a,b*}

^a Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

^c Programa de Pós Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 89218-000, Brasil.

^d Programa de Pós Graduação em Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, Campus UFSM, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil.

*Corresponding author: Profa. Dra. Ana Flávia Furian
Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos,
Universidade Federal de Santa Maria
Prédio 43, Sala 4217
97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.
PHONE: +55 55 3220 8254
E-mail: furian.anaflavia@gmail.com

Submetido para a revista Food and Chemical Toxicology

Abstract

Aflatoxin B1 (AFB1) is the most common mycotoxin and highly toxic, causing carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects. The aim of our study was to evaluate the acute effects caused by oral administration of AFB1 on behavioral tests and biochemical parameters. Young male Wistar rats received one administration of AFB1 (250 µg / kg) and 48 hours after were submitted to behavioral analysis. After the tests biochemical parameters were determined on cerebral cortex. The results show that the acute intoxication by AFB1 causes neurotoxic effects, evidenced by significant reduction in the levels of ascorbic acid and non-protein sulfhydryl groups, accompanied by the increase in immunoreactivity ratio of protein kinase C phosphorylated/total (p-PKC α Ser957/PKC α). In this acute protocol AFB1 was able to cause toxic effects in the central nervous system without any behavioral alteration.

Key-words: aflatoxin B1, mycotoxin, Protein kinase C, ascorbic acid, non protein thiols

Introduction

Aflatoxin B1 (AFB1) is a naturally occurring mycotoxin produced by genus *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* (CORCUERA *et al.*, 2011; AHMAD, 2013). Aflatoxin B1 (AFB1) presents the highest toxic potential (CAST, 2003), commonly found to contaminate a variety of food commodities such as maize and other types of crop especially during the process of production, harvesting, storage or processing (LOGRIECO, 2003).

In 1987, AFB1 was classified as group 1 human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (VENTURA *et al.*, 2004; HUANG *et al.*, 2010; SHYAMAL *et al.*, 2010). In humans, acute aflatoxicosis is manifested by vomiting, abdominal pain, pulmonary edema, coma, convulsions, and death with cerebral edema and fatty involvement of the liver, kidney, and heart, this being the only human study investigating the acute effect of aflatoxins (STROSNIDER *et al.*, 2006a). It has been estimated that aflatoxins, through food and polluted air, negatively impact up to 5 billion people who live in warm and humid climates (WILLIAMS *et al.*, 2004a). After exposition to AFB1, it is activated by CYP3A4, an enzyme of the cytochrome P450 family, and formed AFB1-8,9-exo-epoxide and AFB1-8,9-endo-epoxide (GALLAGHER *et al.*, 1994; PARTANEN *et al.*, 2010). The AFB1-8,9-endo-epoxide is more stable than AFB1-8,9-exo-epoxide (GUENGERICH *et al.*, 1998) and exo-epoxide can interact covalently with DNA to form 8,9-dihydro- 8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1 (AFB1-N7-Gua) (WILD e TURNER, 2002). The metabolic effects of aflatoxin includes inhibition of DNA, RNA and protein synthesis (BUSBY W. F. JR.. 1981).

Moreover, there is also increasing evidence of the toxic effects of AFB1 on central nervous system (CNS). In fact, repeated administration of AFB1 decreases Na⁺, K⁺-ATPase in the cerebrum of rats (IKEGWUONU, 1983), alters the levels of various biogenic amines in the brain of mice (JAYASEKARA *et al.*, 1989) and significantly alter whole-brain serotonin (5-HT) values in chickens (AHMED *et al.*, 1984). So this implications on behavioral parameters on rats was not yet evaluated.

In addition, AFB1 was also shown to increases rat brain content of the lipoperoxidation biomarkers malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals (GESING e KARBOWNIK-LEWINSKA, 2008). It is suggested that toxic effects of AFB1 are mediated by increased production of reactive species such as O₂• the •OH and the H₂O₂ during the hepatic metabolism of mycotoxin (TOWNER *et al.*, 2003b).

Adding, oxidative stress could modulate the activity of Na⁺, K⁺-ATPase, since ROS modifies the lipid composition of plasma membrane (JAMME *et al.*, 1995a), induces protein

carbonylation (DEAN *et al.*, 1997) and so increases susceptibility to proteolysis and impairment of protein functionality. Consequently, changes in the Na⁺, K⁺-ATPase directly affect cell signaling via neurotransmitters and neuronal activity, causing an increase or decrease in neuronal excitability, depending on the degree of inhibition induced, neuronal type and activity affected (GRISAR *et al.*, 1992; MOSELEY *et al.*, 2007). Therefore, the aim of this study was to investigate the acute effects of AFB1 on behavioral tests as well as biomarkers of oxidative stress, Na⁺, K⁺-ATPase activity and immunoreactivity of PKA and PKC on cerebral cortex of rats.

Materials and methods

Animals and reagents

Young male Wistar rats (60–80g) were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to water and food (Supra; Santa Maria, RS, Brazil). All experimental protocols were designed with the goal of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process 093/2014). Aflatoxin B1 (Cas. No. 1162-65-8; ≥ 95 % purity) was obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). A stock solution of AFB1 was prepared dissolving it in DMSO 0.02 %.

Experimental design and sampling

Rats were weighed and randomly divided in two groups which received one AFB1 administration at a dose of 250 µg/kg p.o. (QIAN *et al.*, 2013) or DMSO 0.02%, p.o. (vehicle). Forty eight hours after AFB1 or vehicle administration the animals were subjected to behavioral tests.

After the tests, the cerebral cortex were removed, weighed and homogenized in Tris-HCl 30 mM, pH 7.4 for the determination of neurochemical assays.

Behavioral Tests

Open-field test

The open field task is a simple assessment used to determine general activity levels, gross locomotor activity and exploration habits in rodents. Two days (48h) after the treatment with AFB1 or vehicle, rats were placed in the central area of a round open field (56 cm in diameter), which had its floor divided into 10 equal areas. Five areas of the apparatus had their borders limited by the walls of the arena and considered as peripheral areas. The remaining five areas that had no contact with the walls of the apparatus were central areas. The time spent in central areas was measured as an index of anxiety-like behavior. The number of crossed areas (crossing) as well as the number of rearing responses (animal stands on its hind legs) was recorded for 5 minutes.

Novel object recognition

The novel object recognition task measures a form of declarative memory (CLARK *et al.*, 2005; ZOU *et al.*, 2006). Two days (48h) after the treatment with AFB1 or vehicle, rats were submitted to test, consisted of three sessions, namely, training (first session), short-term memory evaluation (second session; 4 hours after training), and long term memory evaluation (third session; 24 hours after training). During the training session, two identical objects (transparent cylindrical plastic bottles) were equidistantly placed in the center of the same open-field arena described above, and the time spent in exploration of each object was recorded during 5 minutes. Four hours after the training one of the bottles was replaced for a new object (a plastic red apple), and the time spent in exploration of the each object were measured over 5 minutes. At last, 24 hours after training the plastic red apple was replaced for another new object (triangular plastic cup), and the time spent in exploration of each object was recorded during 5 minutes. Data collected 4 or 24 hours after training were used as measures of short- and long-term memory, respectively. The object recognition index was calculated with the following formula: Recognition index = (time spent in new object)/ (time spent in the new object + time spent in the already known object). Smaller values of recognition index are indicative of novel object memory impairment. The analyses excluded data from any subject that failed to explore the objects in any of the test sessions.

Forced Swim Test

The forced swim test was performed according to (SUNAL *et al.*, 1994). Rats were placed in individual, clear polyvinyl chloride (PVC) cylinders (45 cm tall x 20 cm diameter) containing 23-25°C water (20 cm-deep to prevent the rat's tail from touching the cylinder bottom). Water was changed between subjects. The immobility time during the 5 minutes of test was recorded. Immobility was assigned when no additional activity was observed other than that required to keep the rat's head above water. Increased immobility time is an index of depressive-like behavior.

Taste preference test

The consumption of a sweetened solution is a taste preference experiment designed to examine a behavioral correlate of anhedonia (i.e. inability to experience pleasure) (MAZARATI *et al.*, 2008). In this test rat were placed in individual cages. Each cage access to two bottles, one with water (100 mL) and other with a 4% aqueous sucrose solution (100 mL). Water and sucrose consumption over 24 hours were measured and sucrose preference was evaluated. Lower sucrose preference is indicative of anhedonia and therefore depressive-like behavior.

Elevated plus maze (EPM)

The EPM consisted of a plus-shaped platform (50 cm higher than ground level) with two open (50 x 10 cm) and two enclosed arms (50 x 10 cm). Rats were placed individually on the center of the platform facing one of the open arms and were allowed to freely explore the maze for 5 minutes of testing period. During the test open arms and closed arms entries and time in open arms were counted. Greater time in open arms and open arms entries indicates anxiety.

Neurochemical assays

Non protein thiols (NPSH) determination

NPSH levels of cerebral cortex and testes samples were determined according to the method proposed by (ELLMAN, 1959) with some modifications. Samples were precipitated with TCA (10%) and subsequently centrifuged at 3000 g for 10 min. After the centrifugation, the supernatant fraction (60 μ l) was added to a reaction medium containing potassium phosphate buffer (1 M, pH 7.4) and DTNB (10 mM). NPSH levels were measured spectrophotometrically at 412 nm. Results were calculated in relation to a standard curve constructed with cystein and corrected by the protein content. Results were calculated as nmol NPSH/mg of protein.

Ascorbic acid determination

Cerebral cortex ascorbic acid determination was performed as described by (JACQUES-SILVA *et al.*, 2001). Protein was precipitated in 10 V of a cold 5% trichloroacetic acid solution. An aliquot of sample (300 μ L), in a final volume of 575 μ L of the solution, was incubated with TCA 13,3%, and a color reagent containing dinitrophenyl hydrazine, thiourea and CuSO_4 , at 37 °C for 3h, then 500 μ L H_2SO_4 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined spectrophotometrically at 520 nm as μ g ascorbic acid/mg protein.

Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined in cerebral cortex, according to the method described by (MISRA e FRIDOVICH, 1972). This method is based on the ability of SOD in inhibiting autoxidation of adrenaline to adrenochrome. Briefly, the supernatant fraction (20–60 μ l) was added to a medium containing glycine buffer (50 mM; pH 11.3) and adrenaline (1 mM). The kinetic analysis of SOD was started after adrenaline addition, and the color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 30 °C, and results were expressed as Units (U)/mg of protein.

Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of (HABIG *et al.*, 1974). The reaction mixture contained an aliquot of supernatant of cerebral cortex, 0.1

M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB/min/mg of protein.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) determination

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS and was expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content, according to the method described by (BOEIRA *et al.*, 2012). TBARS content was measured in a medium containing 100 μ L of tissue homogenate, 15 μ L of 8.1% SDS, 60 μ L of acetic acid buffer (2.5 M, pH 3.4), and 115 μ L of 0.81% thiobarbituric acid. The mixture was heated at 95 °C for 120 min in a water bath. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm. The results were calculated as μ mol MDA/mg of protein.

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements

Cerebral cortex were homogenized in ice-cold 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) and Na⁺,K⁺-ATPase activity determination was performed as described by (OLIVEIRA, M. S. *et al.*, 2009). The assay medium consisted of 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5mM KCl, 6m MMgCl₂ and 20 μ g of protein in the presence or absence of ouabain. In order to investigate whether some Na⁺,K⁺-ATPase α isoform is selectively changed, we used a classical pharmacological approach, based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (NISHI *et al.*, 1999). We measured ouabain-sensitive ATPase activity using 8 μ M (which inhibits Na⁺,K⁺-ATPase α 2/ α 3) or 12 mM ouabain (which inhibits all isoforms). The reaction was initiated through addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 12 mM.

After 30 min at 37°C, the reaction was stopped through the addition of 25 μ l of 70% (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with regard to protein and time. Appropriate controls were included in the assays to control for non-enzymatic hydrolysis of ATP. Inorganic phosphate (Pi) released was quantified with the colorimetric method described by (FISKE, 1925), using KH₂PO₄ as reference standard. Specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in % of control.

Western blot analysis

Western blot analysis was carried out, as described previously (CASU *et al.*, 2007) with minor modifications. Rats were decapitated, and the cerebral cortex were rapidly removed, dissected homogenized on ice in tissue protein extraction reagent T-PER (Thermo Scientific) supplemented with HaltTM protease and phosphatase inhibitors Cocktail (100x) (Thermo Scientific). Homogenized samples were then centrifuged at 10,000g at 4 ° C for 5 minutes and supernatant kept for further manipulation.

An aliquot (20 µg protein) of the supernatant was diluted in Laemmli buffer and distilled water, and subjected to a temperature of 90°C for 5 minutes. The protein was then subjected to electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (PVDF).

After blocking the membrane with 2.5% (w / v) bovine serum albumin (BSA) in Tris (TBS) for 1 hour, then exposed to primary antibody for 12 hours at a temperature of 4 ° C. At the end of this period the membranes are washed three times in Tris containing 0.01% (v/v) Tween 20 (TBS-T) and incubated again with a secondary antibody for 4 hours.

We used antibodies to anti-phospho-PKA RII α , anti-total-PKA RII α , anti-phospho-PKC α e anti-total-PKC α , membranes were dried, scanned, and quantified with the software ImageJ. The results were normalized for the control group, densitometry values and expressed as the relative amount of phosphorylated and non-phosphorylated forms, and the phosphorylated/total ratio. Blots were developed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, dried, scanned, and quantified with ImageJ software (RIID: nif-0000-30467).

Slot blot analysis

We determine protein carbonyls and 3-nitrotyrosine (3-NT) by slot blot following immunoprecipitation. Slot blot was performed as described in detail by (JOSHI *et al.*, 2006). Briefly, 10µg of protein was loaded in each well on a nitrocellulose membrane under vacuum using a slot blot apparatus (Bio-Rad). Membranes were blocked with 5% (W/V) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS), for 1 h and incubated for 4 h at 4°C with a dilution of anti-DNP (1:100) or anti 3-NT (1:5000) antibodies in TBS. Blots were developed using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, dried, scanned, and quantified with ImageJ software (RIID: nif-0000-30467).

Protein determination

Protein content was measured colorimetrically to analyze NPSH, ascorbic acid, SOD, GST, TBARS, using method of Bradford (BRADFORD, 1976) or by the bicinchoninic acid method using a commercially available kit (Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit) to analyze Na^+, K^+ -ATPase activity determination, Western blot analysis and slot blot. Bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard for quantification of both methods.

Statistical analysis

Graphpad prism 5 software was used for statistical analysis and for plotting graphs. Statistical analysis was carried out by the Student's *t* test, and $P < 0.05$ was considered significant. All data are reported as mean and S.E.M.

Results

The aim of this study was to investigate the acute toxic effects of AFB1 48 h after a single oral administration in Wistar male rats. In order to investigate whether this mycotoxin affects motor and exploratory behavior in rats, animals were observed in open field paradigm. Table 1 shows the effect of AFB1 on open-field performance. No significant differences in locomotor or exploratory activity (number of crossing, number of rearing responses, time spent in center (%)) and latency to exploration (s) were observed in AFB1 treated mice when compared with vehicle group [$t(20) = 0.8509$; $P = 0.4049$; $t(20) = 0.5344$; $P = 0.5989$; $t(20) = 0.3267$; $P = 0.7473$; $t(20) = 0.7844$; $P = 0.4420$].

In order to investigate effects of acute exposition to AFB1 on behavior and motor skills we tested the animals in novel object recognition, forced swim test, taste preference and elevated plus maze. No significant differences were found in the object recognition index measured 4 hours after training (i.e. short-term memory) [$t(13) = 0.009525$; $P = 0.9925$; Table 2] and recognition index 24 hours after training (i.e. long-term memory) [$t(13) = 0.9792$; $P = 0.3454$; Table 2]. Moreover, no significant differences were found in immobility time in the forced swim test [$t(16) = 0.04241$; $P = 0.9667$; Table 2], and in preference of sucrose [$t(18) = 1.785$; $P = 0.0911$; Table 2]. No significant differences were found regarding total fluid (water plus sucrose) consumption [$t(18) = 0.5190$; $P = 0.6101$; Table 2].

Table 3 shows the results for the elevated plus maze. Open arms entries and time spent in the open arms indicates anxiety, however in this protocol we do not observed significant differences on % of entries into the open arms [$t(8)= 1.300$; $P= 0.2298$], % entries in the closed arms [$t(8)= 1.309$; $P= 0.2268$] and % time spend in closed arms [$t(8)= 0.04608$; $P= 0,9644$] after AFB1 exposition.

In order to evaluate the role of oxidative stress on the effects induced by acute administration of AFB1 on cerebral cortex, we investigated indicators of oxidative stress. Statistical analyses revealed that levels of NPSH [$t(18)= 5.760$; $P<0.0001$] and ascorbic acid [$t(18)= 4.488$; $P=0.0003$] were reduced by only one AFB1 administration (Figure 1(A) and 1(B) respectively). Additionally, TBARS content [$t(18) = 0.2876$; $P= 0.770$], SOD [$t(18)= 0.1756$; $P= 0.8626$] and GST [$t(18)= 1.166$; $P= 0.2589$] activities were not statistically different (Table 4). Moreover, carbonyl and 3-nitrotyrosine content on cerebral cortex was also determinate, and no significant difference between groups were observed [$t(10)= 0.6388$; $P= 0.5373$ fig 2A]; [$t(10)= 1.180$; $P= 0.2654$ fig. 2B].

In addition, we investigated if acute AFB1 administration interfere in neuronal excitability by Na^+, K^+ -ATPase activity determination. Statistical analyses revealed that after 48h of exposition to AFB1, total Na^+, K^+ -ATPase, $\alpha 1$ and $\alpha 2/\alpha 3$ activity were not altered by mycotoxin [$t(18)= 1.098$; $P= 0.2866$, fig 3A]; [$t(18)= 0.05775$; $P=0.9546$ Fig 3B]; [$t(18)= 2.093$; $P= 0.0508$, Fig 3C].

In the last set of experiments, we investigated the effect of acute AFB1 on PKC and PKA immunoreactivity. We observed an increased expression of p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio Figure 4A [$t(8)= 3.066$, $P= 0.0154$], with no changes in p-PKA Ser96 /PKA II α subunit ratio figure 4B [$t(10)=0.1165$; $P= 0.9095$].

Discussion

The presence of mycotoxins in food is a recurrent problem in many countries. Many studies have focused mainly on the chronic toxic effects of these mycotoxins mainly aflatoxins, because of their carcinogenicity, hepatotoxicity and mutagenicity (HUSSEIN e BRASEL, 2001). Accordingly, increasing evidence suggest that acute exposure to aflatoxins causes deleterious effects to liver, kidney, gastrointestinal, respiratory, immune, cardiovascular and central nervous systems in humans and animals (IARC, 1993b; PERAICA *et al.*, 1999; HUSSEIN e BRASEL, 2001).

In the present study we investigated the effects of acute oral exposure to AFB1 on behavioral tests and some indicators of oxidative stress and neural excitability in young rats. Our behavioral results suggest that acute AFB1 does not display any behavioral alteration, in motor coordination, exploration response, anxiety, depression and memory. In addition, we observed that non enzymatic soluble antioxidant defenses, ascorbic acid and NPSH, are reduced in cerebral cortex by only one administration of this mycotoxin. However, the content of TBARS, carbonilated proteins and 3-nitrotyrosine were not altered by AFB1, as SOD and GST activities. Independent of behavioral manifestations, the mycotoxin could alter the neural excitability, so we determined if AFB1 modify Na^+, K^+ -ATPase activity and immunoreactivity of PKA and PKC. In this acute protocol, the activity of total, $\alpha 1$ and $\alpha 2/\alpha 3$ isoforms of Na^+, K^+ -ATPase were not altered by mycotoxin. At the same time, AFB1 increased expression of p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio, and caused no changes in p-PKA Ser96 /PKA II α subunit ratio.

It is known that AFB1 causes an alteration in the metabolism of tryptophan in the brain, which reduces concentrations of serotonin (KIMBROUGH *et al.*, 1992b). Moreover, it has been demonstrated that a repeated exposure to AFB1 decreases striatal dopamine and serotonin concentrations, 37 and 29% respectively, suggesting that the major effect of AFB1 is on dopaminergic pathways, possible by selectively perturbing the conversion of tyrosine to biogenic catecholamine neurotransmitters (COULOMBE e SHARMA, 1985). In addition, acute AFB1 exposure decreased brain acetylcholinesterase, whereas the chronic exposure increased adenohipophyseal acetylcholinesterase (EGBUNIKE e IKEGWUONU, 1984). Thus, these changes in the levels of neurotransmitters and enzymes could modify the behavior of animals, so it is possible that dietary intake of this mycotoxin may be one of the causes of certain idiopathic and debilitating diseases in humans. Recently, it has been published some effects of prenatal exposition to AFB1 on behavioral alterations in rat offspring. Behavioral observations such as cliff avoidance, negative geotaxis, surface rightening activity, ascending wire mesh, open field behavior, and exploratory and locomotor activities were significantly impaired in experimental pups when compared to control pups (KIHARA *et al.*, 2000; SUPRIYA e REDDY, 2015). Therefore, we decided to test the if acute exposition to AFB1 in young rats modify locomotor and exploratory responses, as well as recognition test object, forced swim test, preference for sucrose and elevated plus maze. Our behavioral tests results showed that there were no changes in any behavioral parameter analyzed 48h after AFB1 exposition to young rats. So, we cannot exclude that this mycotoxin could be responsible for behavioral alterations in other exposition protocols.

In fact, AFB1 interacted directly with neuronal cells and caused a dose- and time-dependent decrease in cell number. Interestingly, the cytotoxic effect decrease in cell survival was already evident after exposure to the toxin for 12 hours, and post mitotic neurons were also susceptible to AFB1 toxicity, indicating an acute cellular response which could be due to interference with signal transduction mechanisms (BONSI, 1996). In the brain, Na⁺,K⁺-ATPase activity plays an important role since decrease in its activity influence neuronal excitability, neurotransmitters signaling and as a consequence the whole animal behavior (LEES *et al.*, 1990b; JAMME *et al.*, 1995a; LI e STYS, 2001; MOSELEY *et al.*, 2007). In this study we investigated the effect of acute AFB1 exposition on Na⁺,K⁺-ATPase activity in young rats. In this acute protocol total Na⁺,K⁺-ATPase, $\alpha 1$ and $\alpha 2/3$ isoforms activities were not altered by the mycotoxin in the cerebral cortex. Previous studies showed that repeated injections of AFB1 (16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p./ 6 weeks) in rats increases central and peripheral Na⁺,K⁺-ATPase β -glucuronidase, and β -galactosidase, and decreases the activity of Mg²⁺-ATPase (IKEGWUONU, 1983). In addition, unpublished data of our group show that acute AFB1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.o.) do not modify Na⁺,K⁺-ATPase activity, but in combination with a low dose of PTZ (30 mg/kg/ i.p.) a significant decrease in total, $\alpha 1$ and $\alpha 2/3$ Na⁺,K⁺-ATPase activities and reduced latency to PTZ-induced myoclonic seizures was observed.

Moreover, several studies show the involvement of oxidative stress in the toxicity induced by AFB1, and attribute this to the characteristic hepatotoxicity induced by this mycotoxin. It is suggested that the toxic effects are mediated by increased production of reactive species such as superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide during the hepatic metabolism of mycotoxin (TOWNER *et al.*, 2003b). So, only few studies have investigated the effect of AFB1 on brain oxidative stress. It has been showed that administration of AFB1 (25 mg/kg/p.o./90 days) reduces the activity of glutathione reductase, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) and increases malondialdehyde (MDA) levels (YENER *et al.*, 2009). In addition, the antioxidant *Urtica dioica L.* (2 ml/kg/p.o./90 days) reversed these effects in brain showing the neurotoxic effects of AFB1 and neuroprotective effects of *Urtica dioica L.* A possible neurotoxic effect of AFB1 (1250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bw/day/14 days) was also suggested by (KANBUR *et al.*, 2011), which demonstrated that there was an increase in MDA levels and CAT activity in the brain. Recently, (KARABACAK *et al.*, 2015) confirm increased MDA levels, SOD and CAT activity on brain after AFB1 (400 $\mu\text{g}/\text{kg}$.bw/day/28days) exposition to Sprague-Dawley female rats.

Considering our present results, acute oral administration of AFB1 (250 µg/kg p.o.) produced a significant decrease in ascorbic acid and non protein thiols (NPSH) content in cerebral cortex. We do not observe any significant alteration on MDA levels, carbonyl and 3-nitrotyrosine content, as well as in antioxidant enzymes SOD and GST in cerebral cortex. One possible explanation for the slight toxic effects of AFB1 on oxidative stress markers found in the present study compared with studies of (KANBUR *et al.*, 2011) (YENER *et al.*, 2009), and (KARABACAK *et al.*, 2015) is the use of smaller dose of AFB1, and the acute exposition versus the sub acute or chronic protocols. Furthermore, the species, age and sex of animals are diverse, contributing to the variations in results. Additionally, it has been proposed that one of toxic mechanism of aflatoxins is the consumption of glutathione storage (ALM-ELDEEN *et al.*, 2015). Moreover, ebselen an organic compound of selenium protects the cytotoxicity of AFB1 through to antioxidant capacity (YANG *et al.*, 2000). So, these studies are in agreement with our results demonstrated by reduced NPSH content in cerebral cortex after acute AFB1 exposition.

Besides oxidative stress mechanisms of toxicity of AFB1, it has been suggested that this mycotoxin also activates protein kinase C, and this effect could have a crucial role on its toxicity and carcinogenesis. Activation of PKC is associated with regulatory processes in different subcellular compartments and it is also believed to influence important processes of neuronal physiology (MILLER, 1986). Moreover, it is known that PKC serves as a receptor for tumor promoters (NISHIZUKA, 1984). In this line of view, (VAN DEN HEEVER e DIRR, 1991) demonstrate that AFB1 (0.1 µM) serves as an activator for protein kinase C (PKC) in human platelets. In addition, Mistry *et al.*, 2001, shows that activation of PKC by aflatoxin B1 (7 mg/kg), during regeneration of liver cells when PKC is normally inhibited, may possibly create conditions conducive to carcinogenesis. Furthermore, our results are in agreement with these studies, since we show that acute AFB1 exposition increases expression of p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio. It's a relevant finding since only one exposition to this mycotoxin is responsible to activate a mechanism for development carcinogenesis.

In conclusion, acute exposition to AFB1 display neurotoxic effects as demonstrated by reduced NPSH and ascorbic acid levels and increased expression of p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio on cerebral cortex, without any behavioral alteration in young rats.

Acknowledgements

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS, grant #1879-25.51/13-6) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant #471653/2013-6). L.R.R, L.F.F.R., M.R.F., M.S.O., A.F.F. are the recipients of CAPES fellowships; N.S.S. and M.L.F are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship. Authors thank to Dr. Carlos Fernando de Mello for providing laboratory facilities. We also thank to Camilla de Oliveira Lima, Érica Misievicz Colin, Aline dos Santos e Silva and Clarissa Vasconcelos de Oliveira for their technical assistance.

Figure Legends

Figure 1: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition in (A) non protein thiols (NPSH) and (B) ascorbic acid content on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

* Indicates a significant difference compared to vehicle group.

Figure 2: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on (A) protein carbonyl content and (B) 3-nitrotyrosine (3-NT) content on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 6 animals in each group.

Figure 3: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on (A) total activity of Na⁺,K⁺-ATPase, (B) α1 activity and (C) α2/α3 activity on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

Figure 4: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on the levels of (A) p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio and (B) p-PKA Ser96 /PKA II α subunit ratio on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 5-6 animals in each group.

* Indicates a significant difference compared to vehicle group.

Table 1: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on open field test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 11 animals in each group.

Table 2: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition in novel object recognition, forced swim test and taste preference sucrose test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 6-10 animals in each group.

Table 3: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on elevated plus maze test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 5 animals in each group.

Table 4: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on TBARS content, SOD and GST activities on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

References

- AHMAD, M. A. M.; HAMID, R.; ABDIN, M. Z.; JAVED, S. Use of response surface methodology to study the effect of media composition on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin Res**, v. 29, p. 39–45, 2013.
- AHMED, K.; ZIEVE, L.; QUARFOTH, G. Effects of methanethiol on erythrocyte membrane stabilization and on Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase: relevance to hepatic coma. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 228, n. 1, p. 103-108, Jan 1984. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6319665>>.
- ALM-ELDEEN, A. A. et al. Synergistic effect of black tea and curcumin in improving the hepatotoxicity induced by aflatoxin B1 in rats. **Toxicol Ind Health**, v. 31, n. 12, p. 1269-1280. Dec 2015. ISSN 1477-0393 (Electronic) 0748-2337 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796760>>.
- BOEIRA, S. P. et al. Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. **Toxicol**, v. 60, n. 3, p. 358-366, Sep 1 2012. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583969>>.
- BONSI, P. P. M.; AUGUSTITOCOCO, G. Aflatoxin B-1 cytotoxicity in neurons in culture. **Atla-Altern Lab Anim**, v. 24, p. 533-540, 1996.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>.
- BUSBY, W. F. JR., W. G. N. Aflatoxins. In: SHANK, R. C. (Ed.). *Mycotoxins and N-Nitrosocompounds, Environmental Risks*. **FL: CRC Press Inc**, v. 2, p. 3-27, 1981.
- CAST. *Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems*. Report No. 139. **Council for Agricultural Science and Technology Ames, Iowa, USA.**, 2003.
- CASU, M. A. et al. Effects of acute and chronic valproate treatments on p-CREB levels in the rat amygdala and nucleus accumbens. **Brain Res**, v. 1141, p. 15-24, Apr 13 2007. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270156>>.
- CLARK, R. E.; BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R. Hippocampus and remote spatial memory in rats. **Hippocampus**, v. 15, n. 2, p. 260-72, 2005. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523608>>.
- CORCUERA, L. A. et al. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 26, p. 2733-2740, Sep 15 2011. ISSN 1873-376X (Electronic) 1570-0232 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868292>>.

COULOMBE; SHARMA, R. P. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. **Food Chem Toxicol**, v. 23, n. 9, p. 827-30, Sep 1985. ISSN 0278-6915 (Print) 0278-6915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3930357>>.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem J**, v. 324 (Pt 1), p. 1-18, May 15 1997. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164834>>.

EGBUNIKE, G. N.; IKEGWUONU, F. I. Effect of aflatoxicosis on acetylcholinesterase activity in the brain and adenohypophysis of the male rat. **Neurosci Lett**, v. 52, n. 1-2, p. 171-174, Nov 23 1984. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6098873>>.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, May 1959. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13650640>>.

FISKE, C. H., SUBBAROW, Y.,. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem.**, v. 66, p. 375-400, 1925.

GALLAGHER, E. P. et al. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. **Cancer Res**, v. 54, n. 1, p. 101-8, Jan 1 1994. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261428>>.

GESING, A.; KARBOWNIK-LEWINSKA, M. Protective effects of melatonin and N-acetylserotonin on aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rats. **Cell Biochem Funct**, v. 26, n. 3, p. 314-9, Apr 2008. ISSN 1099-0844 (Electronic) 0263-6484 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868196>>.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res**, v. 12, n. 2, p. 141-9, Jul 1992. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1327744>>.

GUENGERICH, F. P. et al. Activation and detoxication of aflatoxin B1. **Mutat Res**, v. 402, n. 1-2, p. 121-8, Jun 18 1998. ISSN 0027-5107 (Print) 0027-5107 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675258>>.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-9, Nov 25 1974. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436300>>.

HUANG, B. et al. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v. 662, n. 1, p. 62-8, Mar 3 2010. ISSN 1873-4324 (Electronic) 0003-2670 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152266>>.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-34, Oct 15 2001. ISSN 0300-483X (Print) 0300-483X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567776>>.

IARC. Aflatoxins. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 56, p. 245-395, 1993.

IKEGWUONU, F. I. The neurotoxicity of aflatoxin B1 in the rat. **Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 247-59, 1983. ISSN 0300-483X (Print) 0300-483X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6138886>>.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 88, n. 3, p. 119-25, Mar 2001. ISSN 0901-9928 (Print) 0901-9928 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245406>>.

JAMME, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 333-7, Dec 29 1995. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742483>>.

JAYASEKARA, S. et al. Alteration of biogenic amines in mouse brain regions by alkylating agents. I. Effects of aflatoxin B1 on brain monoamines concentrations and activities of metabolizing enzymes. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 18, n. 3, p. 396-403, May-Jun 1989. ISSN 0090-4341 (Print) 0090-4341 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499275>>.

JOSHI, G. et al. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane)dihydrochloride (AAPH) or Fe(2+)/H(2)O(2): insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. **Neurochem Int**, v. 48, n. 4, p. 318-27, Mar 2006. ISSN 0197-0186 (Print) 0197-0186 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386335>>.

KANBUR, M. et al. The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 9, p. 1960-4, Sep 2011. ISSN 1873-6351 (Electronic) 0278-6915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600263>>.

KARABACAK, M. et al. Effects of Tarantula cubensis D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. **Homeopathy**, v. 104, n. 3, p. 205-10, Jul 2015. ISSN 1476-4245 (Electronic) 1475-4916 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143454>>.

KIHARA, T. et al. Effects of prenatal aflatoxin B1 exposure on behaviors of rat offspring. **Toxicol Sci**, v. 53, n. 2, p. 392-9, Feb 2000. ISSN 1096-6080 (Print) 1096-0929 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696787>>.

KIMBROUGH, T. D.; LLEWELLYN, G. C.; WEEKLEY, L. B. The effect of aflatoxin B1 exposure on serotonin metabolism: response to a tryptophan load. **Metab Brain Dis**, v. 7,

n. 4, p. 175-182, Dec 1992. ISSN 0885-7490 (Print) 0885-7490 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1284170>>.

LEES, G. J. et al. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 120, n. 2, p. 159-62, Dec 11 1990. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705675>>.

LI, S.; STYS, P. K. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. **Neuroscience**, v. 107, n. 4, p. 675-83, 2001. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720790>>.

LOGRIECO, A., BOTTALICO, A., MULE, G., MORETTI, A. AND PERRONE, G. . Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **Eur J Plant Pathol**, v. 109, p. 645-667, 2003.

MAZARATI, A. et al. Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. **Brain**, v. 131, n. Pt 8, p. 2071-83, Aug 2008. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559371>>.

MILLER, R. Protein kinase C: a key regulator of neuronal excitability? . **Trend Neurosci**, v. 9, p. 538-540, 1986.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. **J Biol Chem**, v. 247, n. 11, p. 3410-3414, Jun 10 1972. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337853>>.

MOSELEY, A. E. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-26, Jan 17 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234593>>.

NISHI, A. et al. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 4, p. 1492-501, Oct 1999. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501194>>.

NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. **Nature**, v. 308, n. 5961, p. 693-8, Apr 19-25 1984. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6232463>>.

OLIVEIRA, M. S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 2, p. 416-26, Apr 2009. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200345>>.

PARTANEN, H. A. et al. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. **Toxicol Sci**, v. 113, n. 1, p. 216-25, Jan 2010. ISSN 1096-0929 (Electronic) 1096-0929 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875679>>.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bull World Health Organ**, v. 77, n. 9, p. 754-66, 1999. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534900>>.

QIAN, G. et al. Integrative toxicopathological evaluation of aflatoxin B(1) exposure in F344 rats. **Toxicol Pathol**, v. 41, n. 8, p. 1093-105, 2013. ISSN 1533-1601 (Electronic) 0192-6233 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423819>>.

SHYAMAL, S. et al. Hepatoprotective effect of three herbal extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver. **Singapore Med J**, v. 51, n. 4, p. 326-31, Apr 2010. ISSN 0037-5675 (Print) 0037-5675 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20505912>>.

STROSNIDER, H. et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 12, p. 1898-903, Dec 2006. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185282>>.

SUNAL, R.; GUMUSEL, B.; KAYAALP, S. O. Effect of changes in swimming area on results of "behavioral despair test". **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 4, p. 891-6, Dec 1994. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886103>>.

SUPRIYA, C.; REDDY, P. S. Prenatal exposure to aflatoxin B1: developmental, behavioral, and reproductive alterations in male rats. **Naturwissenschaften**, v. 102, n. 5-6, p. 26, Jun 2015. ISSN 1432-1904 (Electronic) 0028-1042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911313>>.

TOWNER, R. A. et al. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 10, p. 1330-40, Nov 15 2003. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607532>>.

VAN DEN HEEVER, L. H.; DIRR, H. W. Effect of aflatoxin B1 on human platelet protein kinase C. **Int J Biochem**, v. 23, n. 9, p. 839-43, 1991. ISSN 0020-711X (Print) 0020-711X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1773888>>.

VENTURA, M. et al. Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1048, n. 1, p. 25-9, Sep 3 2004. ISSN 0021-9673 (Print) 0021-9673 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15453415>>.

WILD, C. P.; TURNER, P. C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 471-81, Nov 2002. ISSN 0267-8357 (Print) 0267-8357 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435844>>.

WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 5, p. 1106-22, Nov 2004. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531656>>.

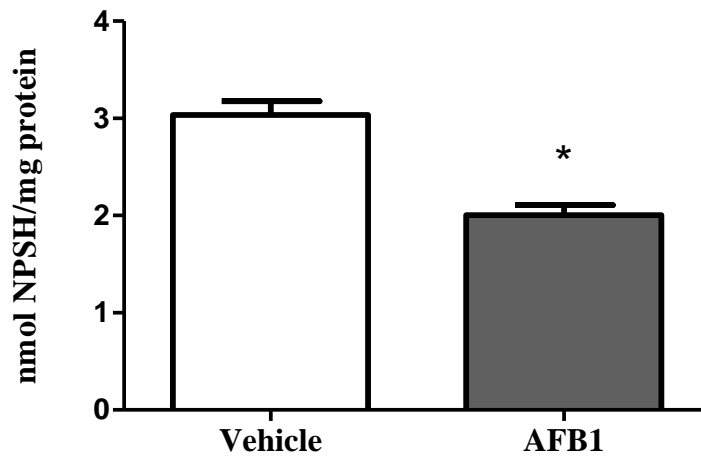
YANG, C. F. et al. Protective effect of ebselen on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in primary rat hepatocytes. **Pharmacol Toxicol**, v. 86, n. 4, p. 156-61, Apr 2000. ISSN 0901-9928 (Print) 0901-9928 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815748>>.

YENER, Z. et al. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 2, p. 418-24, Feb 2009. ISSN 1873-6351 (Electronic) 0278-6915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073231>>.

ZOU, L. B. et al. Inhibition of neprilysin by infusion of thiorphan into the hippocampus causes an accumulation of amyloid Beta and impairment of learning and memory. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 317, n. 1, p. 334-40, Apr 2006. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382024>>.

Figure 1:

A



B

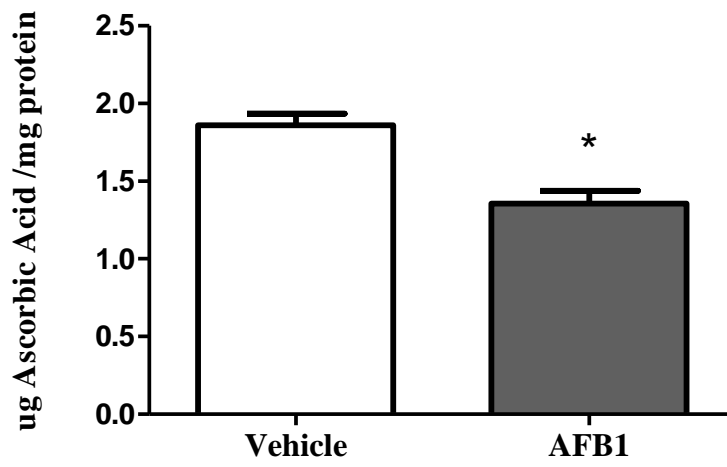


Figure 2:

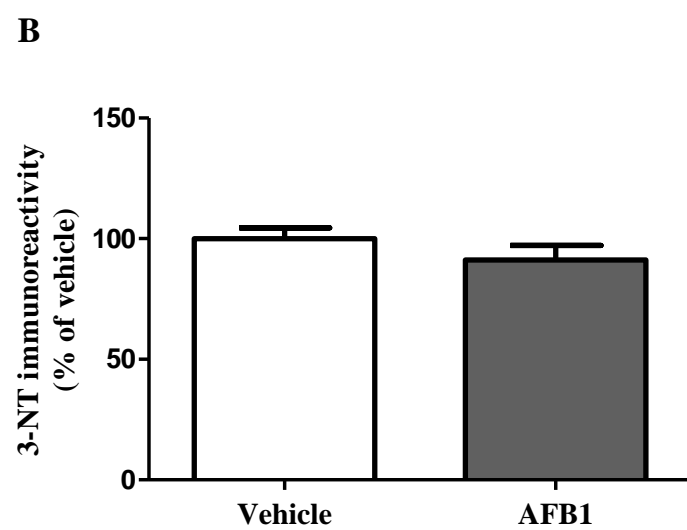
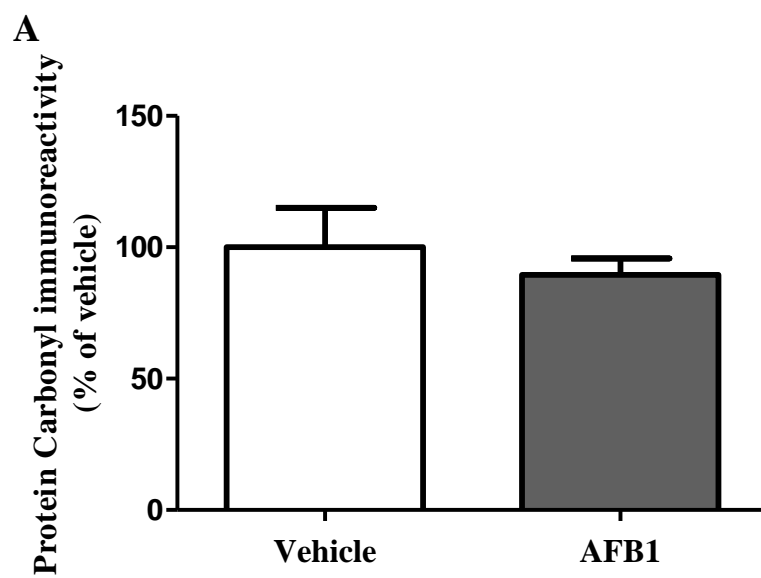


Figure 3:

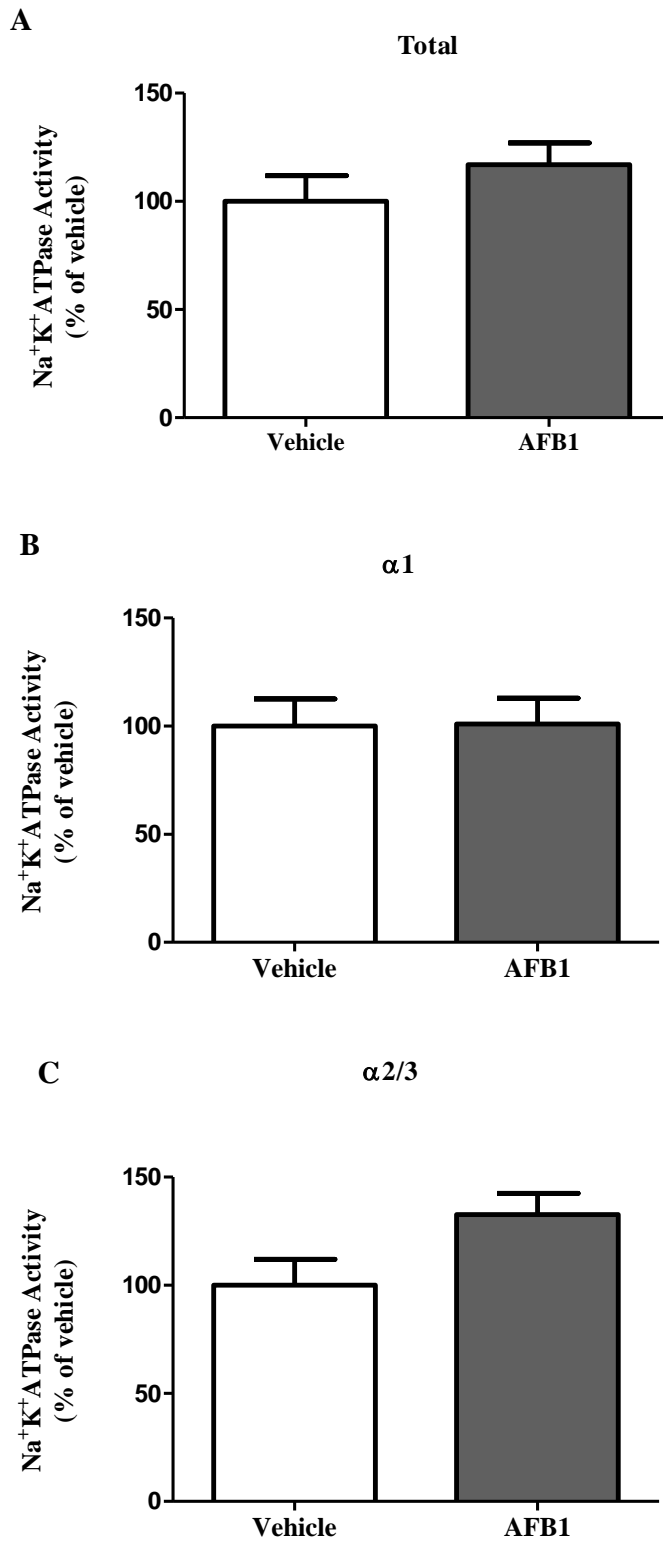


Figure 4:

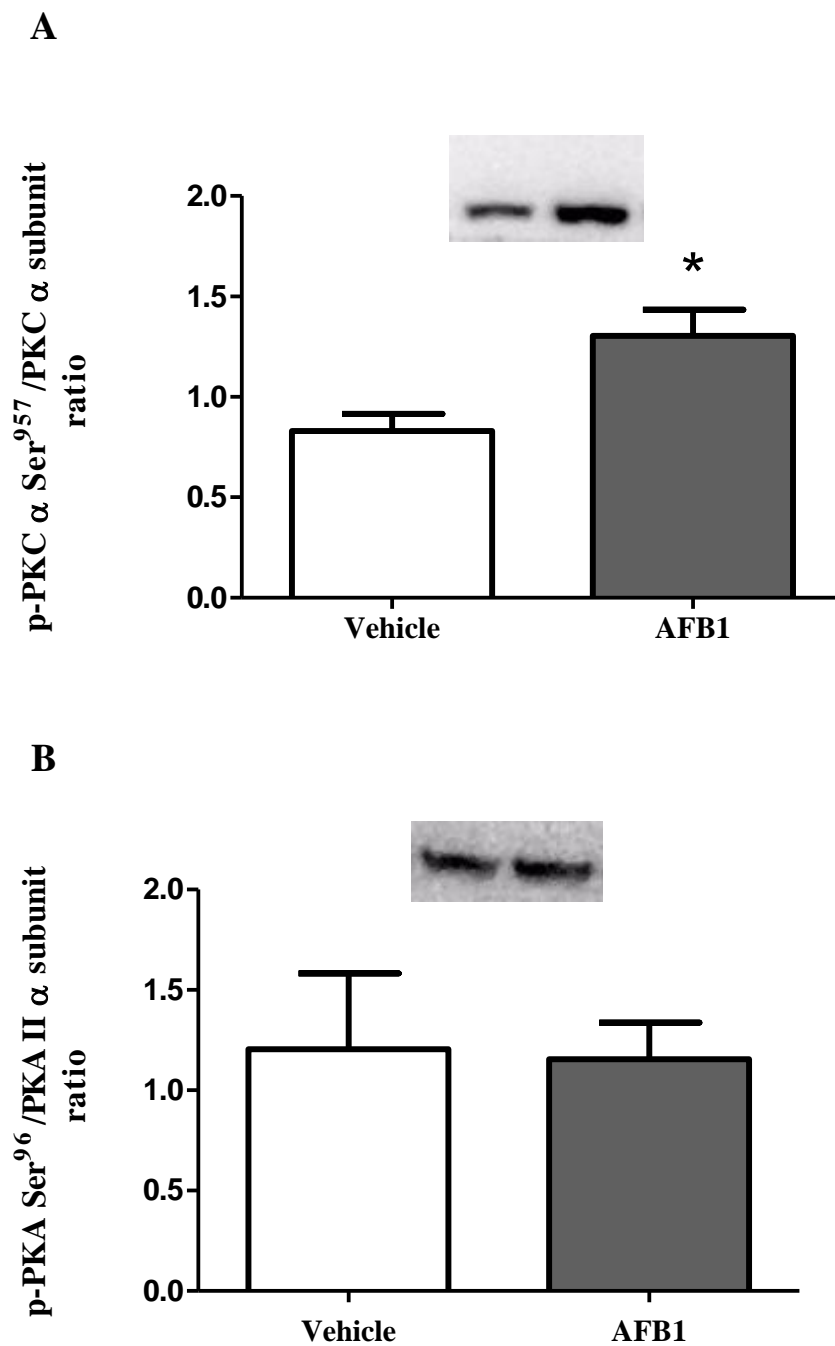


Table 1: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on open field test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 11 animals in each group.

| Open Field | Treatment | | | |
|----------------------------|-----------|---------|-------|---------|
| | Vehicle | | AFB1 | |
| Crossing | 39.82 | ± 7.862 | 31.91 | ± 4.959 |
| Rearing response | 7.091 | ± 2.758 | 5.273 | ± 1.991 |
| Time spent in center (%) | 15.45 | ± 3.822 | 13.45 | ± 4.781 |
| Latency to exploration (s) | 6.364 | ± 1.941 | 10.09 | ± 4.337 |

Table 2: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition in novel object recognition, forced swim test and taste preference sucrose test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 6-10 animals in each group.

| | Treatment | | | |
|--------------------------------|-----------|---------|-------|---------|
| | Vehicle | | AFB1 | |
| Recognition index 4 hours (s) | 0.577 | ± 0.12 | 0.576 | ± 0.10 |
| Recognition index 24 hours (s) | 0.69 | ± 0.08 | 0.801 | ± 0.06 |
| Immobility time (s) | 84.22 | ± 15.28 | 85.00 | ± 10.14 |
| Preference of sucrose (mL) | 61.63 | ± 4.5 | 70.61 | ± 2.154 |
| Total fluid consumption (mL) | 44.50 | ± 5.576 | 41.40 | ± 2.141 |

Table 3: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on elevated plus maze test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 5 animals in each group.

| Elevated plus maze | Treatment | |
|----------------------------|---------------|---------------|
| | Vehicle | AFB1 |
| % Entries into Open arms | 46.15 ± 3.710 | 50.00 ± 1.757 |
| % Entries into Closed arms | 53.85 ± 3.710 | 50.00 ± 1.757 |
| % Time in Closed arms (s) | 82.73 ± 3.664 | 82.93 ± 2.327 |

Table 4: Effect of aflatoxin B1 (250 µg/kg/p.o.) 48h after exposition on TBARS content, SOD and GST activities on cerebral cortex of young rats. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

| | Treatment | |
|--------------------------------|---------------|---------------|
| | Vehicle | AFB1 |
| TBARS (µmol MDA/mg protein) | 0.126 ± 0.007 | 0.129 ± 0.007 |
| SOD (Units (U)/mg protein) | 25.89 ± 1.904 | 26.50 ± 2.860 |
| GST (nmol CDNB/mg protein/min) | 6.843 ± 1.100 | 5.443 ± 0.481 |

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que:

- 1- A exposição aguda à AFB1 não alterou o comportamento motor e exploratório dos ratos no teste do campo aberto.
- 2- Não observamos diferenças entre os grupos nos parâmetros de ansiedade avaliados nos testes do labirinto em cruz elevado e no teste do campo aberto.
- 3- A exposição aguda à AFB1 não interferiu na capacidade de aprendizagem e memória dos animais nos parâmetros quantificados no teste de localização e reconhecimento de objetos.
- 4- A exposição aguda à AFB1 não induziu comportamento tipo depressivo quando verificado nos testes do nado forçado e preferência por sacarose.
- 5- A exposição aguda à AFB1 não alterou a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase total, $\alpha 1$ e $\alpha 2/3$ no córtex cerebral 48h após a exposição.
- 6- A exposição aguda à AFB1 não alterou a maioria dos marcadores de estresse oxidativo avaliados, apenas observamos uma redução significativa nos níveis de ácido ascórbico e grupos tióis não proteicos, no córtex cerebral dos animais.
- 7- A exposição aguda à AFB1 aumentou a imunorreatividade da relação da proteína quinase C fosforilada/ total (p-PKC α Ser957/PKC α), sem alterar a relação da proteína quinase A fosforilada/ total (p-PKA Ser 96 /PKA II α) no córtex cerebral.

Concluimos que 48 horas após a exposição aguda a AFB1 não foram observadas alterações comportamentais nos parâmetros avaliados de exploração, locomoção, depressão, ansiedade e memória. Entretanto neste protocolo agudo, a micotoxina reduziu os níveis de ácido ascórbico e grupos tióis não proteicos no córtex cerebral, mostrando a participação do estresse oxidativo na toxicidade. Além disso, mostramos um aumento da imunorreatividade da relação p-PKC α Ser957/ PKC α no córtex cerebral. Mais estudos são necessários para elucidar se a AFB1 é capaz de alterar parâmetros comportamentais, bem como seu possível mecanismo de toxicidade, considerando exposições crônicas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, H. K. et al. Relationships between aflatoxin production and sclerotia formation among isolates of *Aspergillus* section Flavi from the Mississippi Delta. **European Journal of Plant Pathology**, v. 112, n. 3, p. 283-287, Jul 2005. ISSN 0929-1873. Disponível em: <<Go to ISI>://000230263100008>.
- ABDEL-WAHHAB, M. A. et al. Potential protective effect of HSCAS and bentonite against dietary aflatoxicosis in rat: with special reference to chromosomal aberrations. **Nat Toxins**, v. 6, n. 5, p. 211-8, 1998. ISSN 1056-9014 (Print) 1056-9014 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10398518>.
- ABIDIN, I. et al. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. **Int. J. Neurosci**, v. 114, p. 683-699, 2004.
- ADAMS J.A. Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. **Chem Rev.** v.101, n.8, p.2271–2290, 2001.
- ADELL, A.; CELADA, P.; ABELLAN, M. T. & ARTIGAS, F. Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. **Brain Res Rev**, v. 39, p. 154-180, 2002.
- AGUILAR, F.; HUSSAIN, S. P.; CERUTTI, P. Aflatoxin-B(1) Induces the Transversion of G-]T in Codon 249 of the P53 Tumor-Suppressor Gene in Human Hepatocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 18, p. 8586-8590, Sep 15 1993. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<GotoISI>://A1993LX75000060>.
- AHMAD, M. A. M.; HAMID, R.; ABDIN, M. Z.; JAVED, S. Use of response surface methodology to study the effect of media composition on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Mycotoxin Res**, v. 29, p. 39-45, 2013.
- AHMED, K.; ZIEVE, L.; QUARFOTH, G. Effects of methanethiol on erythrocyte membrane stabilization and on Na⁺,K⁺-adenosine triphosphatase: relevance to hepatic coma. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 228, n. 1, p. 103-108, Jan 1984. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6319665>.
- ALM-ELDEEN, A. A. et al. Synergistic effect of black tea and curcumin in improving the hepatotoxicity induced by aflatoxin B1 in rats. **Toxicol Ind Health**, v. 31, n. 12, p. 1269-1280, Dec 2015. ISSN 1477-0393 (Electronic) 0748-2337 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23796760>.
- AMADIO, M.; BATTAINI, F.; PASCALE, A. The different facets of protein kinases C: old and new players in neuronal signal transduction pathways. **Pharmacol Res**, v. 54, n. 5, p. 317-25, Nov 2006. ISSN 1043-6618 (Print) 1043-6618 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16996748>.
- AMES, A. I. CNS energy metabolism as related to function. . **Braian Res. Rev.**, v. 34, p. 42-68, 2000.

AZMITIA, E. C. Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. **Brain Res Bull**, v. 56, p. 413-424, 2001.

BAGH, M. B. et al. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. **Free Radic Res**, v. 42, n. 6, p. 574-581, Jun 2008. ISSN 1029-2470 (Electronic) 1029-2470 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18569015>>.

BARJA, G. Free radicals and aging. Review. **Trends in Neurosc**, v. 27, p. 595-600, 2004.

BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1083-1152, 1999.

BEDARD, L. L.; MASSEY, T. E. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. **Cancer Lett.**, v. 241, p. 174-183, 2006.

BEER, J. **Doenças infecciosas dos animais domésticos**. v. 2, p. 837, 1991.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 497+, Jul 2003. ISSN 0893-8512. Disponível em: <<Go to ISI>://000184243900008>.

BERNABEU, R. et al. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 13, p. 7041-6, Jun 24 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192688>>.

BERNABEU, R. et al. Learning-specific, time-dependent increase in [3H]phorbol dibutyrate binding to protein kinase C in selected regions of the rat brain. **Brain Res**, v. 685, n. 1-2, p. 163-8, Jul 10 1995. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7583242>>.

BIEHL, M. L.; BUCK, W. B. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. **J. Food Protec.**, v. 50, n. 12, p. 1058-1073, 1987.

BISCHOF, K. R., S. K. Liver Toxicity. In: GUPTA, R. C. **Veterinary Toxicology**, Basic and Clinical Principles, p. 145-160, 2007.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 25, n. 3, p. 205-18, May 2001. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378177>>.

BLUNDELL, J. E. Serotonin and the biology of feeding. **Am. J. Clin Nutr**, v. 55, p. 155S-159S, 1992.

BOEIRA, S. P. et al. Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. **Toxicon**, v. 60, n. 3,

p. 358-366, Sep 1 2012. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583969>>.

BOK, J. W.; KELLER, N. P. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryot Cell**, v. 3, n. 2, p. 527-535, Apr 2004. ISSN 1535-9778 (Print) 1535-9786 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075281>>.

BONSI P., P. M.; AUGUSTITOCOCO, G. Aflatoxin B-1 cytotoxicity in neurons in culture. **Atla-Altern Lab Anim**, v. 24, p. 533-540, 1996.

BORETTI, L. Micotoxinas em poedeiras. **Revista Avicultura Industrial**, v. 1059, p. 41-44, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-254, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>.

BRASIL. Resolução RDC no 7, ANVISA. **Diário Oficial da União**, 2011.

BRERA, C.; MIRAGLIA, M.; COLATOSTI, M. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: Sources of errors. **Microchemical Journal**, v. 59, n. 1, p. 45-49, May 1998. ISSN 0026-265X. Disponível em: <<Go to ISI>://000074023100005>.

BRESSAC, B.; KEW, M.; WANDS, J.; OZTURK, M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. **Nature**, v. 350, p. 429-31, 1991.

BULLERMAN, L. B. Mycotoxins and Food Safety. **Food Technology**, v. 40, n. 5, p. 59-66, May 1986. ISSN 0015-6639. Disponível em: <<Go to ISI>://A1986C346000003>.

BURGUEIRA, J. A. Presence of aflatoxin B1 in human liver referred to as Reye's Syndrome in Venezuela. **Acta Cient. Venez.**, v. 37, p. 325, 1986.

BUSBY W. F. JR., Aflatoxins. In: SHANK, R. C. (Ed.). Mycotoxins and Nitrosocompounds, Environmental Risks. **FL: CRC Press Inc**, v. 2, p. 3-27, 1981.

CAMMAROTA, M. et al. B-50/GAP-43 phosphorylation and PKC activity are increased in rat hippocampal synaptosomal membranes after an inhibitory avoidance training. **Neurochem Res**, v. 22, n. 4, p. 499-505, Apr 1997. ISSN 0364-3190 (Print) 0364-3190 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9130262>>.

CAST. Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Report No. 139. **Council for Agricultural Science and Technology Ames, Iowa, USA.**, 2003.

CASU, M. A. et al. Effects of acute and chronic valproate treatments on p-CREB levels in the rat amygdala and nucleus accumbens. **Brain Res**, v. 1141, p. 15-24, Apr 13 2007. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270156>>.

CECIL. Tratado de medicina interna / editado por Lee Goldman, Dennis Ausiello; [tradução de Ana Kemper...et al.]. **Elsevier**, 2005.

CHETKOVICH, D. M.; SWEATT, J. D. nMDA receptor activation increases cyclic AMP in area CA1 of the hippocampus via calcium/calmodulin stimulation of adenylyl cyclase. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1933-1942, Nov 1993. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7901336>>.

CHUN, H. S. et al. Determination of aflatoxin levels in nuts and their products consumed in South Korea. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 385-391, 2007. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<Go to ISI>://000243541900055>.

CLARK, R. E.; BROADBENT, N. J.; SQUIRE, L. R. Hippocampus and remote spatial memory in rats. **Hippocampus**, v. 15, n. 2, p. 260-272, 2005. ISSN 1050-9631 (Print) 1050-9631 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15523608>>.

COBB, M.H. Progress in biophysics and molecular biology. v. 71, p. 479. 1999.

COPPOCK, R. W.; CHRISTIAN, R.G. & JACOBSEN, B. J. Aflatoxins. **Veterinary Toxicology** v. Basic and Clinical Principles 2, p. 1181 - 1199, 2012.

CORCUERA, L. A. et al. Validation of a UHPLC-FLD analytical method for the simultaneous quantification of aflatoxin B1 and ochratoxin a in rat plasma, liver and kidney. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 879, n. 26, p. 2733-2740, Sep 15 2011. ISSN 1873-376X (Electronic) 1570-0232 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21868292>>.

COULOMBE, R. A. Aflatoxins. **Mycotoxins and phytoalexins**, p. 103-143, 1991.

COULOMBE, R. A., SHARMA, R. P. Clearance and excretion of intratracheally and orally administered aflatoxin B1 in the rat. **Food Chem Toxicol**, v. 23, n. 9, p. 827-830, Sep 1985. ISSN 0278-6915 (Print) 0278-6915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3930357>>.

COULOMBE, R. A.; SHARMA, R. P. Effect of repeated dietary exposure of aflatoxin B1 on brain biogenic amines and metabolites in the rat. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 80, p. 496-501, 1985.

DASH, P. K. et al. cAMP response element-binding protein is activated by Ca²⁺/calmodulin- as well as cAMP-dependent protein kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 11, p. 5061-5065, Jun 1 1991. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1647024>>.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem J**, v. 324 (Pt 1), p. 1-18, May 15 1997. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164834>>.

DEBSKI, E. A. C., Activity-dependent mapping in the retinotectal projection. **Curr. Opin. Neurobiol.** , v. 12, p. 93-99, 2002.

DEVLIN, T.M. Textbook of biochemistry with clinical correlations, 3rd edition. **Wiley-Liss**. p. 319-350, 891, 894, 1992.

DINIZ, S. P. S. S. **Livraria e Editora Rural**, p. 181, 2002.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, Jan 2002. ISSN 0031-9333. Disponível em: <<Go to ISI>://000173028700003>.

EGBUNIKE, G. N.; IKEGWUONU, F. I. Effect of aflatoxicosis on acetylcholinesterase activity in the brain and adenohypophysis of the male rat. **Neurosci Lett**, v. 52, n. 1-2, p. 171-174, Nov 23 1984. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6098873>.

EL-AGAMY, D. S. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B(1)-induced liver injury in rats. **Arch Toxicol**, v. 84, n. 5, p. 389-396, May 2010. ISSN 1432-0738 (Electronic) 0340-5761 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20112103>.

EL-AGMY. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. **Arch. Toxicol**, v. 84, p. 389-396, 2010.

EL-NEKEETY, A. A. et al. Antioxidant properties of Thymus vulgaris oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicol**, v. 57, n. 7-8, p. 984-991, Jun 2011a. ISSN 0041-0101. Disponível em: <<Go to ISI>://000291833400005>.

ENGH, R.A.; BOSSEMEYER, D. The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation. **Advances in Enzyme Regulation**. v. 41, p. 121, 2001.

_____. Antioxidant properties of Thymus vulgaris oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicol**, v. 57, n. 7-8, p. 984-991, Jun 2011b. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477612>.

ELIOT, L. S.; DUDAI, Y.; KANDEL, E. R.; ABRAMS, T. W. Ca²⁺/calmodulin sensitivity may be common to all forms of neural adenylate cyclase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 86, p. 9564-9568, 1989.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-77, May 1959. ISSN 0003-9861 (Print) 0003-9861 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13650640>.

ERECINSKA, M.; CHERAIN, S.; SILVER, I. Energy metabolism in mammalian brain during development. **Prog. Neurobiol**, v. 73, p. 397-445, 2004.

ERECINSKA, M.; SILVER, I. A. Ions and Energy in Mammalian Brain. **Progress in Neurobiology**, v. 43, n. 1, p. 37-71, May 1994. ISSN 0301-0082. Disponível em: <<Go to ISI>://A1994NX89800002>.

ESSIGMANN, J. M.; CROY, R. G.; BENNETT, R. A.; WOGAN, G. N. Metabolic activation of aflatoxin B1: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. **Drug Metab Rev**, v. 13, p. 581-602, 1982.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J. Biol. Chem**, v. 66, p. 375-400, 1925. FORRESTER, L. M.; NEAL, G. E.; JUDAH, D. J.; GLANCEY, M. J.; WOLF, C. R. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 87, p. 8306-8310, 1990.

GALLAGHER, E. P. et al. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P4501A2 and P4503A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. **Cancer Res**, v. 54, n. 1, p. 101-108, Jan 1 1994. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8261428>>.

GARNER, R.; COLIN, M.; CARL, N. Fungal toxins, aflatoxins and nucleic acids. **Chemical Carcinogens and DNA**, p. 187-225, 1979.

GESING, A.; KARBOWNIK-LEWINSKA, M. Protective effects of melatonin and N-acetylserotonin on aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rats. **Cell Biochem Funct**, v. 26, n. 3, p. 314-319, Apr 2008. ISSN 1099-0844 (Electronic) 0263-6484 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17868196>>.

GOLDBLATT, L. A. Mycotoxins - Past, Present and Future. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 54, n. 4, p. A302-A309, 1977. ISSN 0003-021X. Disponível em: <<Go to ISI>://A1977DB72900004>.

GOLDSTEIN, I. et al. Involvement of Na(+), K(+)-ATPase and endogenous digitalis-like compounds in depressive disorders. **Biol Psychiatry**, v. 60, n. 5, p. 491-499, Sep 1 2006. ISSN 0006-3223 (Print) 0006-3223 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16712803>>.

GONÇALEZ, E. F., J. D.; PINTO, M. M.; ROSSI, M. H.; NOGUEIRA, J. H. C.; MANGINELLI, S. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 72, n. 4, p. 435-438, 2005.

GONZÁLEZ, F.H.D & SILVA, S.C. Introdução à bioquímica clinica veterinária. **Porto Alegre: UFRGS**, v. 262, p. 24-32, 2003.

GONZALEZ, E.; PINTO, M. M.; FELICIO, J. D. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. **Biológico**, v. 63, p. 15-19, 2001.

GRIFFIN, J. E. & OJEDA S. R. Textbook of endocrine physiology. **Oxford University Press**, New York, p.66, 67, 149, 1992.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Res**, v. 12, n. 2, p. 141-149, Jul 1992. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1327744>>.

GROOPMAN, J. D. et al. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. **Cancer Res**, v. 52, n. 1,

p. 45-52, Jan 1 1992. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1727385>>.

GUENGERICH, F. P. et al. Activation and detoxication of aflatoxin B1. **Mutat Res**, v. 402, n. 1-2, p. 121-8, Jun 18 1998. ISSN 0027-5107 (Print) 0027-5107 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9675258>>.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J Biol Chem**, v. 249, n. 22, p. 7130-7139, Nov 25 1974. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4436300>>.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **J. Comp. Psychol.**, v. 18, p. 385-403, 1934.

HALLIWELL, B. G., J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press, New york**, p. 617-783, 1999.

HARRIS, C. C. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. **Cancer Res**, v. 51, p. 5023s-5044s, 1991.

HATHOUT, A. S. et al. Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. **Toxicol**, v. 58, p. 179-186, 2011.

HAYES, J. R.; CAMPBELL, T. C. Contaminants. In: CASARETT, L. S. (Ed.). **Toxicology**, v. The basic Science of Poisons, p. 771-800, 1986.

HERNANDEZ-MENDOZA, A.; GARCIA, H. S.; STEELE, J. L. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B-1. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1064-1068, Jun 2009. ISSN 0278-6915. Disponível em: <<Go to ISI>://000266418300004>.

HSIEH, D. P.; ATKINSON, D.N. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. **Adv Exp Med Biol**, v. 283, p. 525-532, 1991.

HSIEH, D. P. H.; ATKINSON, D. N. Bisfuranoid Mycotoxins - Their Genotoxicity and Carcinogenicity. **Biological Reactive Intermediates Iv**, v. 283, p. 525-532, 1991. Disponível em: <<Go to ISI>://A1991BS89K00069>.

HUANG, B. et al. Simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and M2 in peanuts and their derivative products by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal Chim Acta**, v. 662, n. 1, p. 62-68, Mar 3 2010. ISSN 1873-4324 (Electronic) 0003-2670 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20152266>>.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-34, Oct 15 2001. ISSN 0300-483X (Print) 0300-483X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567776>>.

HUSSEIN, H. S., BRASEL, J.M., . Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. . **Toxicology**, v. 167, p. 101-34, 2001.

IARC. Aflatoxins. In: **IRAC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.**, n. 56, p. 243-395, 1993a.

_____. Aflatoxins. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v. 56, p. 245-395, 1993b.

IARC, I. A. F. R. O. C. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans., n. 10, p. 51-52, 1976.

IBRAHIMI, O.A.; ZHANG, F.; HRSTKA, S.C.L.; MOHAMMADI, M.; LINHARDT, R. J. Signal transduction complex assembly. **Biochemistry**. v.43, p.4724-4730, 2004. IKEGWONU, F. I. The neurotoxicity of aflatoxin B1 in the rat. **Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 247-59, 1983. ISSN 0300-483X (Print) 0300-483X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6138886>>.

IMPERATO, R. et al. Survey of aflatoxins and ochratoxin a contamination in food products imported in Italy. **Food Control**, v. 22, n. 12, p. 1905-1910, Dec 2011. ISSN 0956-7135. Disponível em: <<Go to ISI>://000294098400017>.

IMPEY, S. et al. Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. **Neuron**, v. 21, n. 4, p. 869-83, Oct 1998. ISSN 0896-6273 (Print) 0896-6273 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808472>>.

IZQUIERDO, I. **Memória**. Porto Alegre, Artmed., 2002.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol Learn Mem**, v. 68, n. 3, p. 285-316, Nov 1997. ISSN 1074-7427 (Print) 1074-7427 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398590>>.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. **Neurobiol. Learn, Mem**, v. 68, N. 3, p. 285-316, 1997.

IZQUIERDO, I.; MEDINA, J. H. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation. **Behav. Pharmacol.**, v. 11, p. 517-534, 2000.

JACOBS, B. L.; FORNAL, C. A. Activity of serotonergic neurons in behaving animals. **Neuropsychopharmacology.**, v. 21, p. 9S-15S, 1999.

JACQUES-SILVA, M. C. et al. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. **Pharmacol Toxicol**, v. 88, n. 3, p. 119-25, Mar 2001. ISSN 0901-9928 (Print) 0901-9928 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11245406>>.

JAIMÉZ, J. et al. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 882, n. 1-2, p. 1-10, Jun 16 2000. ISSN 0021-9673. Disponível em: <<Go to ISI>://000087789100001>.

JAMME, I. et al. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 333-337, Dec 29 1995a. ISSN 0959-4965 (Print) 0959-4965 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742483>>.

_____. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals. **Neuroreport**, v. 7, n. 1, p. 333-337, Dec 29 1995b. ISSN 0959-4965. Disponível em: <<Go to ISI>://A1995TX36900080>.

JAYASEKARA, S. et al. Alteration of biogenic amines in mouse brain regions by alkylating agents. I. Effects of aflatoxin B1 on brain monoamines concentrations and activities of metabolizing enzymes. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 18, n. 3, p. 396-403, May-Jun 1989. ISSN 0090-4341 (Print) 0090-4341 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499275>>.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annu Rev Physiol**, v. 65, p. 817-849, 2003. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524462>>.

JOSHI, G. et al. In vivo protection of synaptosomes by ferulic acid ethyl ester (FAEE) from oxidative stress mediated by 2,2-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride (AAPH) or Fe(2+)/H(2)O(2): insight into mechanisms of neuroprotection and relevance to oxidative stress-related neurodegenerative disorders. **Neurochem Int**, v. 48, n. 4, p. 318-327, Mar 2006. ISSN 0197-0186 (Print) 0197-0186 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16386335>>.

JOVICIC, M. E. et al. Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase in the rat. **J Alzheimers Dis**, v. 14, n. 1, p. 85-93, May 2008. ISSN 1387-2877 (Print) 1387-2877 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18525130>>.

KANBUR, M. et al. The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 49, n. 9, p. 1960-1964, Sep 2011. ISSN 1873-6351 (Electronic) 0278-6915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21600263>>.

KAPLAN, J. H. Biochemistry of Na,K-ATPase. **Annu Rev Biochem**, v. 71, p. 511-535, 2002. ISSN 0066-4154 (Print) 0066-4154 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045105>>.

KARABACAK, M. et al. Effects of Tarantula cubensis D6 on aflatoxin-induced injury in biochemical parameters in rats. **Homeopathy**, v. 104, n. 3, p. 205-10, Jul 2015. ISSN 1476-4245 (Electronic) 1475-4916 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143454>>.

KIHARA, T. et al. Effects of prenatal aflatoxin B1 exposure on behaviors of rat offspring. **Toxicol Sci**, v. 53, n. 2, p. 392-9, Feb 2000. ISSN 1096-6080 (Print) 1096-0929 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696787>>.

KIMBROUGH, T. D.; LLEWELLYN, G. C.; WEEKLEY, L. B. The Effect of Aflatoxin-B1 Exposure on Serotonin Metabolism - Response to a Tryptophan Load. **Metabolic Brain Disease**, v. 7, n. 4, p. 175-182, Dec 1992a. ISSN 0885-7490. Disponível em: <<Go to ISI>://A1992KP76200002>.

KIMBROUGH, T. D.; LLEWELLYN, G. C.; WEEKLEY, L. B. The effect of aflatoxin B1 exposure on serotonin metabolism: response to a tryptophan load. **Metab Brain Dis**, v. 7, n. 4, p. 175-182, Dec 1992b. ISSN 0885-7490 (Print) 0885-7490 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1284170>>.

KLICH, B. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, p. 497-516, 2003.

KONG, L. N. et al. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 6, p. 666-672, Jun 2005. ISSN 1671-4083 (Print) 1671-4083 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15916731>>.

KUBOTA, H.; KATSURABAYASHI, S.; MOORHOUSE, A. J.; MURAKAMI, N.; KOGA, H.; AKAIKE, N.; GABAB receptor transduction mechanisms, and cross-talk between protein kinases A and C, in GABAergic terminals synapsing onto neurons of the rat nucleus basalis of Meynert. **J Physiol** v. 551, p. 263-276, 2003.

KUMAR, M. et al. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B(1)-induced liver carcinogenesis in rats. **Br J Nutr**, v. 107, n. 7, p. 1006-16, Apr 2012. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816119>>.

LEES, G. J. et al. The Neurotoxicity of Ouabain, a Sodium-Potassium Atpase Inhibitor, in the Rat Hippocampus. **Neuroscience Letters**, v. 120, n. 2, p. 159-162, Dec 11 1990a. ISSN 0304-3940. Disponível em: <<Go to ISI>://A1990EP14300005>.

LEHNINGER; NELSON, D.L., COX, M.M. Principles of biochemistry. 3ed. New York, 2000.

_____. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. **Neurosci Lett**, v. 120, n. 2, p. 159-62, Dec 11 1990b. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1705675>>.

LEESON, S., DIAZ, G., GONZALO, J., SUMMERS, J. D. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. **Guelph: University Books**, p. 352, 1995.

LENT, R. As bases neuronais da memória e da aprendizagem. In: **Cem bilhões de neurônios. Conceitos fundamentais de neurociência**. São Paulo, Rio de Janeiro e Belo Horizonte: Atheneu, v. 18, p. 587-617, 2002.

LEONARD, B. E. serotonin receptors and their function in sleep, anxiety disorders and depression. **Psychother. Psychosom**, v. 65, p. 66-75, 1996.

LEONG, Y. H. et al. Aflatoxin occurrence in nuts and commercial nutty products in Malaysia. **Food Control**, v. 21, n. 3, p. 334-338, Mar 2010. ISSN 0956-7135. Disponível em: <<Go to ISI>://000271613600020>.

LI, S.; STYS, P. K. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. **Neuroscience**, v. 107, n. 4, p. 675-83, 2001. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11720790>.

LIU, L. et al. Role of caveolae in signal-transducing function of cardiac Na⁺,K⁺-ATPase. **Am. J. Physiol.**, v. 284, p. C1550-C1560, 2003.

LOGRIECO, A., BOTTALICO, A., MULE, G., MORETTI, A. AND PERRONE, G. . Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. **Eur J Plant Pathol**, v. 109, p. 645-667, 2003.

LUTTFULLAH, G.; HUSSAIN, A. Studies on contamination level of aflatoxins in some dried fruits and nuts of Pakistan. **Food Control**, v. 22, n. 3-4, p. 426-429, Mar./Apr. 2011. ISSN 0956-7135. Disponível em: <<Go to ISI>://000285952500012>.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Pages 77-102 in Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. Ed. Sociedade Vicente Pallotti, Santa Maria - RS, v. 1, p. 31-73, 2007.

MASSEY, T. E.; STEWART, R. K.; DANIELS, J.M.; LIU, L. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 208, p. 213-227, 1995.

MAYFORD, M.; ABEL, T.; KANDEL, E. R. Transgenic approaches to cognition. **Curr Opin Neurobiol**, v. 5, n. 2, p. 141-148, Apr 1995. ISSN 0959-4388 (Print) 0959-4388 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7620300>.

MAZARATI, A. et al. Depression after status epilepticus: behavioural and biochemical deficits and effects of fluoxetine. **Brain**, v. 131, n. Pt 8, p. 2071-83, Aug 2008. ISSN 1460-2156 (Electronic) 0006-8950 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18559371>.

MCNAMARA, R. K.; SKELTON, R. W. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 18, p. 33-49, 1993.

MEGUID, M. M.; FETISSOV, S. O.; VARMA, M.; SATO, T.; ZHANG, L.; LAVIANO, A.; ROSSIFANELLI, F. Hypothalamic dopamine and serotonin in the regulation of food intake. **Nutritio**, v. 16, p. 843-857, 2000.

MELLO, C. F.; BEGNINI, J.; JIMÉNEZ-BERNAL, R. E.; RUBIN, M. A.; DE BASTIANI, J.; DA COSTA JR, E.; WAJNER, M. Itrastriatal methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. **Brain Res**, v. 721, p. 120-125, 1999.

MILLER, R. Protein kinase C: a key regulator of neuronal excitability? . **Trend Neurosci**, v. 9, p. 538-540, 1986.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The purification and properties of superoxide dismutase from *Neurospora crassa*. **J Biol Chem**, v. 247, n. 11, p. 3410-3414, Jun 10 1972. ISSN 0021-9258

(Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4337853>>.

MOLIN, R.; VALENTINI, M. L. . Simpósio sobre micotoxinas em grãos. **Fundação Cargil**, p. 208p, 1999.

MOREL, P. et al. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes. **Neurochemistry International**, v. 33, n. 6, p. 531-540, Dec 1998. ISSN 0197-0186. Disponível em: <<Go to ISI>://000078990800008>.

MORIN, L. P. Serotonin and the regulation of mammalian circadian rhythmicity. **Ann Med**, v. 31, n. 1, p. 12-33, Feb 1999. ISSN 0785-3890 (Print) 0785-3890 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10219711>>.

MOSELEY, A. E. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. **J Neurosci**, v. 27, n. 3, p. 616-26, Jan 17 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17234593>>.

MOSS, M. O. Secondary Metabolism and Food Intoxication - Molds. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. S80-S88, 1992. ISSN 0021-8847. Disponível em: <<Go to ISI>://A1992JD58000008>.

MOSS, M. O. Recent studies of mycotoxins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 62s-76s, 1998. ISSN 1364-5072. Disponível em: <<Go to ISI>://000075728200009>.

MOSS, M. O. Mycotoxin review – 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. **Mycologist**, v. 16, p. 116-119 2002.

MURAT, K. et al. The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice. **food chem. toxicol.**, v. 49, p. 1960-1964, 2011.

MURPHY, P. A. HENDRICH., S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C.M. . Food Mycotoxins: An Update. **J. Food Scien.**, v. 71, n. 5, p. 51-65, 2006.

NEWTON, A. C. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. **Biochem J**, v. 370, p. 361-371, 2003.

NISHI, A. et al. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. **Journal of Neurochemistry**, v. 73, n. 4, p. 1492-1501, Oct 1999. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10501194>>.

NISHIZUKA, Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. **Nature**, v. 308, n. 5961, p. 693-698, Apr 19-25 1984. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6232463>>.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Determination of Aflatoxins in Peanut Products in the Northeast Region of Sao Paulo, Brazil. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 1, p. 174-183, Jan 2009. ISSN 1422-0067. Disponível em: <<Go to ISI>://000262790100010>.

OLIVEIRA, C. D., & GERMANO, P. Aflatoxina M1 em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. **Hig. Aliment.**, v. 11, p. 22-25, 1997.

OLIVEIRA, L. S. F. Occurrence of *Aspergillus* and aflatoxin in samples of peanuts in natura and peanut sweet. **Rev. Ciênc. Amb**, p. 57-68, 2011.

OLIVEIRA, M. S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 2, p. 416-26, Apr 2009. ISSN 1471-4159 (Electronic) 0022-3042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200345>>.

OZTURK, M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. **Lancet**, v. 338, p. 1356-9, 1991.

PARANG, K.; COLE, P.A. Designing bisubstrate inhibitors of protein kinases. **Pharmacol. Therapy**. v.93, p.145-157, 2002.

PARTANEN, H. A. et al. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. **Toxicol Sci**, v. 113, n. 1, p. 216-25, Jan 2010. ISSN 1096-0929 (Electronic) 1096-0929 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875679>>.

PASCUAL-TERESA, S. D. Molecular mechanisms involved in the cardiovascular and neuroprotective effects of anthocyanins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 559, p. 68-74, 2014.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bull World Health Organ**, v. 77, n. 9, p. 754-66, 1999. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10534900>>.

PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. Ceppa.**, v. 20, p. 141-156, 2002.

PEREIRA, P. et al. Training in the step-down inhibitory avoidance task time-dependently increases cAMP-dependent protein kinase activity in the entorhinal cortex. **Behavioural Pharmacology**, v. 12, n. 3, p. 217-20, Jun 2001. ISSN 0955-8810 (Print) 0955-8810 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11485058>>.

PETERSON, S. W. et al. *Aspergillus bombycis*, a new aflatoxigenic species and genetic variation in its sibling species, *A-nomius*. **Mycologia**, v. 93, n. 4, p. 689-703, Jul-Aug 2001. ISSN 0027-5514. Disponível em: <<Go to ISI>://000170100100008>.

- PLANAS, VILÀ, M. Nutritional and metabolic aspects of neurological diseases **Nutr Hosp.**, p. 29, 2014.
- PROGRAM, N. T. Aflatoxins. **In Report on Carcinogens**, p. 12, 2011.
- PUISIEUX, A. et al. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. **Cancer Res**, v. 51, n. 22, p. 6185-6189, Nov 15 1991. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1933877>>.
- QIAN, G. et al. Integrative toxicopathological evaluation of aflatoxin B(1) exposure in F344 rats. **Toxicol Pathol**, v. 41, n. 8, p. 1093-1105, 2013. ISSN 1533-1601 (Electronic) 0192-6233 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23423819>>.
- QUEVEDO, J. et al. Protein synthesis, PKA, and MAP kinase are differentially involved in short- and long-term memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 154, n. 2, p. 339-343, Oct 5 2004. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15313021>>.
- QUEVEDO, J. et al. Pretraining but not preexposure to the task apparatus prevents the memory impairment induced by blockade of protein synthesis, PKA or MAP kinase in rats. **Neurochem Res**, v. 30, n. 1, p. 61-67, Jan 2005. ISSN 0364-3190 (Print) 0364-3190 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15756933>>.
- RAMOS, A.; MORMEDE, P. Stress and emotionality: a multidimensional and genetic approach. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 22, n. 1, p. 33-57, 1998. ISSN 0149-7634 (Print) 0149-7634 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491939>>.
- RAVINAYAGAM, V. et al. Potential Antioxidant Role of Tridham in Managing Oxidative Stress against Aflatoxin-B(1)-Induced Experimental Hepatocellular Carcinoma. **Int J Hepatol**, v. 2012, p. 428373, 2012. ISSN 2090-3456 (Electronic). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518320>>.
- ROCHA, M. D.; MAIA, P. P.; RODRIGUES, M. A.; MARTINS, I. Incidence of aflatoxins in samples of peanuts and paçoca marketed in the city of Alfenas-MG, Brazil. **Bras. Toxicol**, v. 21, p. 15-19, 2008.
- SABINO, M. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. p. 461-472, 1996.
- SATO, T. et al. Effects of steroid hormones on (Na⁺, K⁺)-ATPase activity inhibition-induced amnesia on the step-through passive avoidance task in gonadectomized mice. **Pharmacol. Res**, v. 49, p. 151-159, 2004.
- SCUSSEL, V. M. **Micotoxinas em Alimentos**. Florianópolis: Insular, p. 144, 1998.
- SHARMA, R. P.; SALUNKHE, D. K. Introduction to mycotoxins. **Mycotoxins and phytoalexins**, p. 775, 1991.

SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives and Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008. ISSN 0265-203X. Disponível em: <<Go to ISI>://000253659900003>.

SHYAMAL, S. et al. Hepatoprotective effect of three herbal extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver. **Singapore Med J**, v. 51, n. 4, p. 326-331, Apr 2010. ISSN 0037-5675 (Print) 0037-5675 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20505912>.

SILVA, R. et al. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacology**, v. 46, p. 895-903, 2004.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 59-63, Jul 5 1996. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<Go to ISI>://A1996UV47800033>.

SOUZA, M. F.; TOME, A. R.; RAO, V. S. Inhibition by the bioflavonoid tennatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. **J Pharm Pharmacol**, v. 51, n. 2, p. 125-9, Feb 1999. ISSN 0022-3573 (Print) 0022-3573 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10217309>.

SQUIREL, L., KANDEL, E. **Memória: da mente as moléculas**,. Porto Alegre, Artmed, 2003.

STAHL, W. L.; HARRIS, W. E. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. **Adv Neurol**, v. 44, p. 681-93, 1986. ISSN 0091-3952 (Print) 0091-3952 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2422895>.

STROSNIDER, H. et al. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 12, p. 1898-1903, Dec 2006a. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185282>.

STROSNIDER, H. et al. Workgroup report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1898-1903, Dec 2006b. ISSN 0091-6765. Disponível em: <<Go to ISI>://000242500200038>.

SUGITA, S.; BAXTER, D. A.; BYRNE, J. H. Modulation of a cAMP/protein kinase A cascade by protein kinase C in sensory neurons of *Aplysia*. **J Neurosci**, v. 17, n. 19, p. 7237-44, Oct 1 1997. ISSN 0270-6474 (Print) 0270-6474 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9295370>.

SUN, M. K.; ALKON, D. L. Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidementic therapeutics. **Pharmacol Ther**, v. 127, n. 1, p. 66-77, Jul 2010. ISSN 1879-016X (Electronic) 0163-7258 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382181>.

SUNAL, R.; GUMUSEL, B.; KAYAALP, S. O. Effect of changes in swimming area on results of "behavioral despair test". **Pharmacol Biochem Behav**, v. 49, n. 4, p. 891-896, Dec

1994. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7886103>>.

SUPRIYA, C.; REDDY, P. S. Prenatal exposure to aflatoxin B1: developmental, behavioral, and reproductive alterations in male rats. **Naturwissenschaften**, v. 102, n. 5-6, p. 26, Jun 2015. ISSN 1432-1904 (Electronic) 0028-1042 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25911313>>.

TEIXEIRA, A. Adequação e apresentação de parâmetros de Validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de Aflatoxina em Castanha-do-Brasil (*Berthollitia excelsa* Bonpl.) através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. p. 57, 2008.

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, n. 3, p. C541-66, Sep 2000. ISSN 0363-6143 (Print) 0363-6143 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10942705>>.

TOWNER, R. A. et al. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 35, n. 10, p. 1330-1340, Nov 15 2003a. ISSN 0891-5849. Disponível em: <<Go to ISI>://000186592300017>.

_____. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. **Free Radic Biol Med**, v. 35, n. 10, p. 1330-1340, Nov 15 2003b. ISSN 0891-5849 (Print) 0891-5849 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14607532>>.

TURNER, J. H. Global WARMTH for Patients with Cancer. **World J Nucl Med**, v. 11, n. 3, p. 103-4, Sep 2012. ISSN 1450-1147 (Print) 1450-1147 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23372446>>.

VAN DEN HEEVER, L. H.; DIRR, H. W. Effect of aflatoxin B1 on human platelet protein kinase C. **Int J Biochem**, v. 23, n. 9, p. 839-843, 1991. ISSN 0020-711X (Print) 0020-711X (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1773888>>.

VARGA, J. F., JENS CHRISTIAN; SAMSON, ROBERT, A. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. **World Mycotoxin Journal**, v. 2, p. 263-277, 2009.

VENTURA, M. et al. Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J Chromatogr A**, v. 1048, n. 1, p. 25-9, Sep 3 2004. ISSN 0021-9673 (Print) 0021-9673 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15453415>>.

VERMA, R. J.; MATHURIA, N. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced lipid-peroxidation in liver and kidney of mice. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 65, n. 2, p. 195-202, Mar-Apr 2008. ISSN 0001-6837. Disponível em: <<Go to ISI>://000256645600004>.

VIANNA, M. R. et al. Role of hippocampal signaling pathways in long-term memory formation of a nonassociative learning task in the rat. **Learn Mem**, v. 7, n. 5, p. 333-40, Sep-Oct 2000. ISSN 1072-0502 (Print) 1072-0502 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11040265>>.

- VIGNINI, A. et al. Modifications of platelet from Alzheimer disease patients: a possible relation between membrane properties and NO metabolites. **Neurobiol Aging**, v. 28, n. 7, p. 987-94, Jul 2007. ISSN 1558-1497 (Electronic) 0197-4580 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16815594>>.
- WAGNER, C. Critical practicalities in sampling for mycotoxins in feed. **J AOAC Int**, v. 98, n. 2, p. 301-308, Mar-Apr 2015. ISSN 1060-3271 (Print) 1060-3271 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25807194>>.
- WANG, H. et al. Quabain assembles signaling cascades through the caveolae Na⁺,K⁺-ATPase. **J. Biol. Chem**, v. 279, p. 17250-17259, 2004.
- WILD, C. P.; TURNER, P. C. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. **Mutagenesis**, v. 17, n. 6, p. 471-481, Nov 2002. ISSN 0267-8357 (Print) 0267-8357 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12435844>>.
- WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, Nov 2004a. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531656>>.
- WOGAN, G. N. Aflatoxin Carcinogenesis - Interspecies Potency Differences and Relevance for Human Risk Assessment. **Relevance of Animal Studies to the Evaluation of Human Cancer Risk**, v. 374, p. 123-137, 1992. ISSN 0361-7742. Disponível em: <<Go to ISI>://A1992BX61Z00009>.
- WOGAN, G. N.; EDWARDS, G. S.; NEWBERNE, P. M. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. **Cancer Res**, v. 31, n. 12, p. 1936-1942, Dec 1971. ISSN 0008-5472 (Print) 0008-5472 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4330435>>.
- WONG, G. J. Mycotoxins and Mycotoxicoses: Aflatoxin. **Botany: Magical Mushrooms and mystical molds**, p. 314-317, 1998.
- WOOD, G. E. Mycotoxins in Foods and Feeds in the United-States. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3941-3949, Dec 1992. ISSN 0021-8812. Disponível em: <<Go to ISI>://A1992KB97400033>.
- WYATT, R. D. Poultry. **In: Mycotoxins and Animal Foods.**, v. 24, p. 553-605, 1991.
- WYSE, A. et al. Training in inhibitory avoidance causes a reduction of Na⁺,K⁺-ATPase activity in rats hippocampus. **Physiol. Behav**, v. 80, p. 475-479, 2004.
- WYSE, A. et al. Preconditioning prevents the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity after brain ischemia. **Neurochem. Res.**, v. 25, p. 969-973, 2000.
- YANG, C. F. et al. Protective effect of ebselen on aflatoxin B1-induced cytotoxicity in primary rat hepatocytes. **Pharmacol Toxicol**, v. 86, n. 4, p. 156-61, Apr 2000. ISSN 0901-9928 (Print) 0901-9928 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815748>>.

YAO, L.; FAN, P.; JIANG, Z.; GORDON, A.; MOCHLY-ROSEN, D.; DIAMOND, I. Dopamine and ethanol cause translocation of epsilonPKC associated with epsilon RACK: cross-talk between cAMP-dependent protein kinase A and protein kinase C signaling pathways. **Mol Pharmacol** v. 73, p. 1105-1112, 2008.

YENER, Z. et al. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 2, p. 418-24, Feb 2009. ISSN 1873-6351 (Electronic) 0278-6915 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19073231>>.

YU, S. Na⁺,K⁺-ATPase: The new face of an old player in pathogenesis and apoptotic/hybrid cell death. **Biochem. Pharmacol**, v. 66, p. 1601-1609, 2003.

ZANGROSSI, H.; POBBE, R. Stimulation of 5-HT neurons in the dorsal raphe nucleus inhibits panic-like behavior in rats by activation of 5-HT_{1A} receptors in the dorsal periaqueductal gray. **European Neuropsychopharmacology**, v. 13, p. S358-S358, Sep 2003. ISSN 0924-977X. Disponível em: <<Go to ISI>://000185412300536>.

ZOU, L. B. et al. Inhibition of neprilysin by infusion of thiorphan into the hippocampus causes an accumulation of amyloid Beta and impairment of learning and memory. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 317, n. 1, p. 334-340, Apr 2006. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16382024>>.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Determinação dos efeitos bioquímicos e comportamentais resultantes da exposição à aflatoxina B1 em ratos."

Número do Parecer: 093/2014

Pesquisador Responsável: Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Furian

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 07/08/2014.

Santa Maria, 07 de Agosto de 2014.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Vania Lucia Loro', positioned above a horizontal line.

Prof. Dr^a. Vania Lucia Loro
Vice-coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM