

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Vinicius Duarte

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA *EX VIVO* PARA
AVALIAÇÃO DE ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS PARA AVES**

Santa Maria, RS

2021

Vinicius Duarte

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA *EX VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE
ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS PARA AVES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann

Santa Maria, RS
2021

Duarte, Vinicius

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA EX VIVO PARA
AVALIAÇÃO DE ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS PARA AVES /
Vinicius Duarte.- 2021.

108 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Augusto Mallmann

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2021

1. Adsorventes 2. Câmaras de Ussing 3. Explante
intestinal 4. Aflatoxina 5. Deoxinivalenol I. Mallmann,
Carlos Augusto II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, VINICIUS DUARTE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Vinicius Duarte

**DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA *EX VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE
ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS PARA AVES**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutor em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 26 de fevereiro de 2021:

Carlos Augusto Mallmann, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Carlos Alberto Araújo de Almeida, Dr. (UFSM)

Catarina Stefanello, Dr. (UFSM)

Erich Helfer Carvalho, Dr. (Boehringer-Ingelheim)

Adriano Olnei Mallmann, Dr. (Pegasus Science)

Santa Maria, RS
2021

AGRADECIMENTOS

Durante os quatro anos de desenvolvimento deste trabalho, obtive o auxílio e colaboração de diversas pessoas e instituições. Meus agradecimentos em especial:

Aos meus pais, Ary e Noeli, por todo apoio recebido, pela educação, pelo imenso carinho e por não medirem esforços para a concretização dos meus sonhos. Sempre terão meu amor e meu respeito.

Aos meus irmãos, Viviane e Ary Jr., pelo companheirismo, apoio e carinho no decorrer desses anos.

À minha esposa Janice, colega e parceira, a quem eu amo muito, por todos os momentos que passamos juntos e pela compreensão nos momentos difíceis. Também à toda sua família, que me acolheu e apoiou durante esse período.

Ao meu orientador, Prof. Carlos Augusto Mallmann, pelo direcionamento, por confiar no meu potencial e na minha capacidade de desenvolvimento desse trabalho. Agradeço pelos ensinamentos, convívio profissional e pessoal.

À Dra Márcia Cristina da Silva por todo auxílio nas análises histológicas e orientação nos testes piloto para validação da metodologia.

À toda equipe do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM (LAMIC), do Instituto SAMITEC - Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas e demais colegas que me auxiliaram, compartilharam suas experiências e tornaram possível a conclusão desse trabalho. Agradecimento em especial: Diogo Liberalesso, Diego Frantz, Bruno, Renê, Igor, Luara, Camila, Cristina, Fernanda, Juliano Vidal, Carlos Almeida, Cristiane Rosa, Dima, Francis, Luciane Gressler, Mara Weise, Maurício Oliveira, Diego Sturza, Leandro, Adriano e Denize.

À Universidade Federal de Santa Maria, ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e seus professores e colaboradores pela estrutura e qualidade do ensino.

Ao LAMIC e ao Instituto SAMITEC pela disponibilização de toda estrutura e auxílio na realização dos experimentos.

Às empresas BRF e C.Vale pela oportunidade, apoio e compreensão nos momentos de minha ausência no trabalho. Gostaria de agradecer em especial aos profissionais Rafael Castro, Christine Maziero, Josmar Rodrigues e Maykon Buttini.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram positivamente para a realização desse trabalho e em toda a minha trajetória!

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA *EX VIVO* PARA AVALIAÇÃO DE ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS PARA AVES

AUTOR: Vinicius Duarte
ORIENTADOR: Carlos Augusto Mallmann

A inclusão de aditivos antimicotoxinas (AAMs) em rações para aves é uma das principais estratégias para reduzir os efeitos prejudiciais das micotoxinas. AAMs são substâncias capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar micotoxinas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia *ex vivo* para avaliação de AAMs utilizados na produção avícola. Explantes jejunais de frangos de corte destinados ao consumo humano foram utilizados em dois estudos para testar a eficácia de AAMs frente à aflatoxina B₁ (AFB₁) e ao deoxinivalenol (DON); o efeito direto de DON sobre as vilosidades intestinais também foi investigado. Quatro pares de câmaras de Ussing com área de contato intestinal de 1,0 cm² foram mantidas a 37 °C e borbulhadas com carbogênio durante 120 min. No estudo 1, seis AAMs disponíveis comercialmente (aditivo antimicotoxinas - AAM 1 a 6) tiveram sua capacidade de reduzir a absorção intestinal de AFB₁ avaliada a fim de verificar eficácia. Explantes jejunais (n=4/ave) foram obtidos de 60 frangos no abate, totalizando 240 amostras (40 amostras/AAM). Os explantes foram submetidos a dois tratamentos por AAM: T1 (controle) - 2,8 mg/L de AFB₁ e T2 - 2,8 mg/L de AFB₁ + 0,5% AAM. Os AAMs também foram testados *in vitro* para avaliar a adsorção de AFB₁ em fluido intestinal artificial. O estudo 2 analisou o impacto deletério de DON sobre as vilosidades intestinais e a eficácia de um AAM. Dois experimentos foram conduzidos para avaliar parâmetros histopatológicos e imunohistoquímicos: Experimento 1) T1 (controle positivo) - somente solução tampão, e T2 - 10 mg/L de DON (duas replicatas/tratamento); e Experimento 2) T1 (controle positivo) - somente solução tampão, T2 (controle negativo) - 10 mg/L de DON, T3 - somente o AAM (0,5%) e T4 - 10 mg/L de DON + 0,5% AAM. Explantes jejunais (n=4/ave) foram obtidos de 22 frangos no abate, totalizando 88 amostras (40 e 48 amostras para os experimentos 1 e 2, respectivamente). Os resultados do estudo 1 demonstraram que AAM1 ao AAM6 reduziram a absorção intestinal de AFB₁ nos ensaios *ex vivo* em 67,11%, 73,82%, 80,70%, 85,86%, 86,28% e 82,32%, respectivamente; já nos testes *in vitro*, AAM1 ao AAM6 apresentaram adsorção de 99,72%, 99,37%, 99,67%, 99,53%, 99,04% e 99,15%, respectivamente. Não houve correlação entre os achados *ex vivo* e *in vitro*. Quanto ao estudo 2, DON reduziu o tamanho dos enterócitos e de seus núcleos e aumentou a vacuolização do citoplasma, o desnudamento do ápice das vilosidades e o número de células apoptóticas no Experimento 1; os parâmetros investigados no Experimento 2 revelaram que o uso do AAM mitigou os efeitos prejudiciais de DON sobre as vilosidades intestinais. A presente avaliação demonstra que o modelo *ex vivo* utilizando explantes intestinais de frangos de corte montados em câmaras de Ussing é uma ferramenta viável para complementar ensaios *in vitro* e *in vivo* empregados na avaliação da eficácia de AAMs e também para a triagem de novos compostos. Além disso, essa metodologia pode ser aplicada para determinar o impacto negativo de DON na integridade do epitélio intestinal de frangos de corte.

Palavras-chave: Adsorventes. Câmaras de Ussing. Explante intestinal. Aflatoxina. Deoxinivalenol.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN *EX VIVO* METHODOLOGY TO EVALUATE ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES IN POULTRY

AUTHOR: Vinicius Duarte
ADVISER: Carlos Augusto Mallmann

Inclusion of antimycotoxins additives (AMAs) in poultry feed is one of the main strategies to reduce the harmful effects of mycotoxins. AMAs are substances capable of adsorbing, inactivating, neutralizing or biotransforming mycotoxins. This work aimed to develop an *ex vivo* methodology to evaluate AMAs used in poultry production. Intestinal explants from broiler chickens destined to human consumption were used in two studies to test the efficacy of AMAs against aflatoxin B₁ (AFB₁) and deoxynivalenol (DON); the direct effect of DON upon intestinal tissue was also investigated. Four pairs of Ussing chambers with an intestinal contact area of 1.0 cm² were used at 37°C and bubbled with carbogen gas for 120 min. In study 1, six commercially available AMAs (antimycotoxins additive - AMA 1 to 6) had their ability to reduce intestinal absorption of AFB₁ evaluated in order to assess efficacy. Jejunal explants (n=4/bird) were collected from 60 broilers at slaughter, totaling 240 samples (40 samples/AMA). The explants were subjected to two treatments per AMA: T1 (control) - 2.8 mg/L of AFB₁, and T2 - 2.8 mg/L of AFB₁ + 0.5% AMA. The AMAs were also tested *in vitro* to investigate AFB₁ adsorption in artificial intestinal fluid. Study 2 analyzed the detrimental impact of DON on intestinal tissue as well as the efficacy of an AMA. Two experiments were conducted to examine histopathological and immunohistochemical parameters: Experiment 1) T1 (positive control) - buffer solution only, and T2 - 10 mg/L DON (two replicates/treatment); and Experiment 2) T1 (positive control) - buffer solution only, T2 (negative control) - 10 mg/L DON, T3 - AMA (0.5%) only, and T4 - 10 mg/L DON + 0.5% AMA. Jejunal explants (n=4/bird) were taken from 22 broilers at slaughter, totaling 88 samples (40 and 48 samples for experiments 1 and 2, respectively). Results of study 1 showed that AMA1 to AMA6 decreased intestinal absorption of AFB₁ in the *ex vivo* assays by 67.11%, 73.82%, 80.70%, 85.86%, 86.28% and 82.32%, respectively; as for the *in vitro* tests, AMA1 to AMA6 presented an adsorption of 99.72%, 99.37%, 99.67%, 99.53%, 99.04% and 99.15%, respectively. No correlation was seen between *ex vivo* and *in vitro* findings. Regarding the second study, DON reduced the size of enterocytes as well as of their nuclei and increased cytoplasmic vacuolization, apical denudation of villi and the number of apoptotic cells in Experiment 1; the parameters investigated in Experiment 2 evidenced that the AMA mitigated the harmful effects of DON upon intestinal villi. The present assessment demonstrates that the *ex vivo* model using intestinal explants from broiler chickens mounted on Ussing chambers is a viable tool to complement *in vitro* and *in vivo* assays employed to evaluate the efficacy of AMAs and also to screen new compounds. Moreover, this methodology may be applied to determine the burden imposed by DON on the integrity of the intestinal epithelium of broilers.

Keywords: Adsorbent. Ussing chambers. Intestinal explant. Aflatoxin. Deoxynivalenol.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 – Esquema simplificado do funcionamento das câmaras de Ussing empregadas para avaliação *ex vivo* do transporte de substâncias em diversos tecidos..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2 – Absorção das principais micotoxinas no trato gastrointestinal (TGI) de aves e suínos **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3 – Principais grupos de aditivos antimicotoxinas sob avaliação ou disponíveis comercialmente. **Erro! Indicador não definido.**3
- Figura 4 – Resultados das avaliações *in vivo* de aditivos antimicotoxinas realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) e no Instituto SAMITEC entre 2005 e 202041
- Figura 5 – Câmaras de Ussing empregadas no desenvolvimento dos testes *ex vivo* utilizando explantes intestinais.....44

CAPÍTULO 3 – USE OF AN *EX VIVO* TEST TO EVALUATE ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES IN POULTRY

- Figure 1. Ussing chambers used in the *ex vivo* tests with jejunal explants of broilers51
- Figure 2. Schematic drawing of a pair of Ussing chambers54
- Figure 3. Aflatoxin B₁ concentration in jejunal explants of broilers in the presence or absence of antimycotoxins additives.....55
- Figure 4. Linearity of the curves of aflatoxin B₁ (AFB₁) recovery with and without the matrix.....57

CAPÍTULO 4 – IMPACT OF DEOXYNIVALENOL ON INTESTINAL EXPLANTS OF BROILER CHICKENS: AN *EX VIVO* MODEL TO ASSESS ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES

- Figure 1. Histological parameters measured in intestinal epithelial explants of 21-day-old broiler chickens.....72
- Figure 2. Histological sections of intestinal villi in explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L or buffer solution only (Control) for 120 min..75
- Figure 3. Histological sections of intestinal villi in explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L for 120 min.76
- Figure 4. Histological analysis of cytoplasmic vacuolization of enterocytes in explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L or buffer solution only (Control) for 120 min.....77

Figure 5. Immunohistochemical analysis of caspase-3 in intestinal epithelial explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L or buffer solution only (Control) for 120 min 81

Figure 6. Histological sections of intestinal epithelial explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to T1) buffer solution only (Control), T2) deoxynivalenol (DON), T3) antimycotoxins additive (AMA) or T4) DON+AMA for 120 min to assess the efficacy of the AMA. 83

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

Figura 6 – Regiões do intestino delgado de frangos de corte utilizados nos testes *ex vivo* nas câmaras de Ussing 94

Figura 7 – Viabilidade dos explantes intestinais conforme o tempo de permanência do tecido na câmara de Ussing 95

Figura 8 – Imagens histológicas dos segmentos de intestino montados nas câmaras de Ussing durante 120 min, expostos somente à solução tampão 96

Figura 9 – Detalhe do topo da vilosidade indicando a preservação dos microvilos. 97

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Distribuição dos tratamentos e inclusão de micotoxinas e aditivos antimicotoxinas (AAMs) na dieta experimental dos animais **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2 – Biomarcadores mais relevantes para avaliar a eficácia de um aditivo antimicotoxinas em reduzir a contaminação das micotoxinas no alimento **Erro! Indicador não definido.**

CAPÍTULO 3 – USE OF AN *EX VIVO* TEST TO EVALUATE ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES IN POULTRY

Table 1. Results of *ex vivo* and *in vitro* tests evaluating six antimycotoxins additives against aflatoxin B₁ in broilers56

Table 2. Matrix effect on aflatoxin B₁ (AFB₁) recovery from intestinal samples of broilers56

CAPÍTULO 4 – IMPACT OF DEOXYNIVALENOL ON INTESTINAL EXPLANTS OF BROILER CHICKENS: AN *EX VIVO* MODEL TO ASSESS ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES

Table 1. Effect of deoxynivalenol (DON) inclusion on histopathological and immunohistochemical parameters measured in intestinal explants from broilers subjected to the Ussing Chamber process for 120 min.74

Table 2. Effect of an antimycotoxins additive (AMA) on histopathological and immunohistochemical parameters measured in intestinal explants from broilers exposed to deoxynivalenol (DON).....82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAs	Agentes Adsorventes
ABs	Agentes de Biotransformação
AAM	Aditivo Antimicotoxinas
AAMs	Aditivos Antimicotoxinas
AFLA	Aflatoxina
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
cm	Centímetro
CO ₂	Gás Carbônico
DON	Deoxinivalenol
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
FUM	Fumonisina
FUM B ₁	Fumonisina B ₁
FUM B ₂	Fumonisina B ₂
HPLC-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
HSCAS	Aluminossilicato de cálcio e sódio hidratado
IPEC-1	Linhagem celular epitelial intestinal de suínos
kg	Quilograma
LAMIC	Laboratório de Análises Micotoxicológicas
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
mg	Miligramma
min	minutos
NIV	Nivalenol
O ₂	Oxigênio
OTA	Ocratoxina A
pH	Potencial Hidrogeniônico
QOS	Quito-oligossacarídeo
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
TEER	Resistência elétrica transepitelial
TGI	Trato gastrointestinal
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
YCW	Parede celular de leveduras
ZEA	Zearalenona
15-ADON	15-acetil-deoxinivalenol

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 HIPÓTESES.....	16
Hipótese 1	16
Hipótese 2	16
Hipótese 3	16
Hipótese 4	16
1.3 PROPOSIÇÃO	17
1.3.1 Objetivo geral	17
1.3.2 Objetivos específicos	17
CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 CÂMARAS DE USSING	18
2.2 TÉCNICAS DE ESTUDO EX VIVO	21
2.3 CÂMARAS DE USSING PARA ANÁLISES DE INTESTINO EX VIVO	23
2.4 IMPACTO DAS MICOTOXINAS NA SANIDADE AVÍCOLA	24
2.5 IMPACTO DAS MICOTOXINAS NA INTEGRIDADE INTESTINAL.....	26
2.5.1 Deoxinivalenol	27
2.5.2 Fumonisina	29
2.5.3 Aflatoxina	30
2.6 ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS	31
2.6.1 Agentes Adsorventes	34
2.6.2 Agentes de biotransformação	36
2.7 TESTES DE EFICÁCIA DE ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS	37
2.7.1 Testes in vitro	38
2.7.2 Testes in vivo	40
2.7.3 Testes ex vivo	42
2.7.4 Colorimetria	45
CAPÍTULO 3 – USE OF AN EX VIVO TEST TO EVALUATE ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES IN POULTRY	46
ABSTRACT	47
INTRODUCTION.....	48
MATERIAL AND METHODS	49
RESULTS.....	53
DISCUSSION.....	57
CONCLUSIONS	60
ACKNOWLEDGEMENTS.....	61
DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS.....	61
FUNDING	61
REFERENCES.....	61
CAPÍTULO 4 – IMPACT OF DEOXYNIVALENOL ON INTESTINAL EXPLANTS OF BROILER CHICKENS: AN EX VIVO MODEL TO ASSESS ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES	66
ABSTRACT	67
INTRODUCTION.....	68
MATERIAL AND METHODS	70
RESULTS AND DISCUSSION	74
CONCLUSION	85

CREDIT AUTHORSHIP CONTRIBUTION STATEMENT	85
DECLARATION OF COMPETING INTEREST	85
ACKNOWLEDGEMENTS	85
REFERENCES	86
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO	92
CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta tese estão apresentados sob a forma de artigos que foram submetidos às revistas científicas *Alternatives to Laboratory Animals* e *Food and Chemical Toxicology*, disponíveis nos capítulos 3 e 4, respectivamente. As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS contemplam somente os estudos citados nos capítulos 2 e 5.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira ocupa espaço de destaque no contexto internacional. Além disso, há perspectivas de crescimento no consumo interno de carne de frango, sendo uma importante fonte de proteína barata para a população. Considerando-se a relevância do setor avícola para o país, a realização de novos investimentos em tecnologia e pesquisa torna-se indispensável.

Os números da avicultura brasileira são referências mundiais. A tecnologia que gera esses índices invejáveis, tanto em qualidade como em quantidade, está em constante evolução, e com isso a busca por novos conhecimentos, produtos e análises é permanente. Os novos itens desenvolvidos para atender aos desafios impostos pelos consumidores e concorrentes a fim de manter a qualidade e a competitividade da carne brasileira no mercado mundial precisam ser testados. Portanto, existe demanda do setor produtivo por estudos de avaliação de eficácia em Centros de Pesquisas e Universidades.

Nesse contexto, cooperativas, laboratórios e indústrias produtoras de insumos para a área avícola solicitam ao Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC), da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), o desenvolvimento de estudos e projetos de pesquisa. Com mais de 30 anos de experiência, o LAMIC, juntamente com o Instituto SAMITEC - Soluções Analíticas Microbiológicas e Tecnológicas Ltda, tem realizado testes de avaliação de aditivos antimicotoxinas (AAMs) utilizando ensaios *in vitro* que empregam suco gástrico e intestinal, além de ensaios *in vivo* utilizando animais alojados em unidades experimentais.

Dados obtidos a partir de avaliações realizadas no LAMIC de 1998 a 2020 indicam que cerca de 50% dos AAMs investigados apresentaram capacidade de adsorção superior a 90% em testes *in vitro*. Porém, nos ensaios *in vivo*, esse índice não corresponde ao desempenho apresentado pelos produtos. Cerca de 25% dos produtos reprovados em avaliações *in vivo* para as principais micotoxinas em aves e suínos apresentam capacidade de adsorção maior que 90% em estudos *in vitro*. Da mesma forma, 42% dos aprovados em ensaios *in vivo* demonstraram capacidade de adsorção *in vitro* inferior a 90% (testes em pH 3 e 6). Portanto, evidencia-se que produtos ineficientes em situações menos realísticas, como as encontradas em testes *in vitro*, podem muitas vezes apresentar desempenho satisfatório em ensaios de

campo. Submetendo esses mesmos dados a uma análise de regressão linear, verificou-se não haver correlação significativa entre os testes *in vivo* e *in vitro*, independente das condições empregadas nestes últimos.

Tais dados revelam que resultados de avaliações *in vitro* não são suficientes para a comprovação da eficácia de um aditivo antimicotoxinas (AAM), havendo a necessidade de resultados satisfatórios obtidos através de ensaios *in vivo*. Mesmo mimetizando as condições do meio através da produção de sucos gástrico e intestinal, o teste *in vitro* configura uma simulação aproximada. Sendo assim, deve ser usado para triagem de potenciais produtos e para controle de qualidade dos diferentes lotes de AAMs previamente aprovados *in vivo*.

No entanto, aspectos éticos e financeiros têm limitado o uso de animais para experimentação científica. Novas técnicas de pesquisa estão sendo exaustivamente estudadas com o objetivo de torná-las viáveis para reduzir o número de animais necessários nos estudos, ou ainda eliminá-los por completo. Dentre essas técnicas destaca-se o teste *ex vivo*. Esse modelo é útil para pesquisa de novas drogas e aspectos de eficácia e citotoxicidade de compostos antes de ensaios clínicos. Recentemente, grupos de pesquisadores têm utilizado o modelo explante em estudos toxicológicos para investigar o efeito das micotoxinas em diversos órgãos de aves e suínos, principalmente no intestino. Porém, ainda não há relatos e descrição de metodologia na literatura científica a respeito do uso de testes *ex vivo* em câmaras de Ussing objetivando determinar a eficácia de AAMs para aves.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver uma técnica *ex vivo* para complementar a avaliação da eficácia de AAMs para aves. Dessa forma, se buscou estabelecer um método científico inovador que apresenta benefícios como rapidez, baixo custo e redução no número de animais, para ser empregado por instituições de pesquisa e empresas.

1.2 HIPÓTESES

Hipótese 1

É possível manter um segmento intestinal de aves viável fora do animal por um determinado período utilizando uma câmara de Ussing e solução tampão fisiológica.

Hipótese 2

A metodologia *ex vivo* pode mensurar a passagem e absorção das micotoxinas em explantes intestinais de frangos de corte.

Hipótese 3

A eficácia de AAMs para aves pode ser avaliada através de uma metodologia *ex vivo*, com auxílio de câmaras de Ussing.

Hipótese 4

A metodologia *ex vivo* é útil para avaliar o impacto negativo das micotoxinas sobre os parâmetros de integridade e morfologia intestinal.

1.3 PROPOSIÇÃO

1.3.1 Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia *ex vivo* para avaliação de AAMs utilizados na produção avícola.

1.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o tempo de viabilidade do tecido intestinal de aves montado em câmaras de Ussing;
- Avaliar o potencial de diferentes partes do intestino delgado de aves como modelos para testes de absorção de micotoxinas;
- Avaliar a eficácia de AAMs para aves disponíveis comercialmente em reduzir a absorção intestinal de micotoxinas, utilizando um modelo *ex vivo* em câmaras de Ussing;
- Verificar o efeito das micotoxinas sobre parâmetros morfológicos intestinais, através de análises histopatológicas, utilizando um modelo *ex vivo*;

CAPÍTULO 2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂMARAS DE USSING

O sistema de câmaras de Ussing recebeu este nome em homenagem ao zoólogo dinamarquês Hans H. Ussing, que inventou o dispositivo na década de 1950 para medir a corrente de curto-circuito como um indicador do transporte de íons na pele de rã (USSING; ZERHAN, 1951). Inicialmente, Hans H. Ussing investigava o fenômeno do transporte ativo de íons, eletrólitos e nutrientes, além do transporte de fármacos, que ocorre através de tecidos epiteliais (LE FERREC et al., 2001). A pele de rã foi utilizada como modelo devido à sua capacidade de transporte do cloreto de sódio da superfície da pele para o interstício em mais de cem concentrações diferentes. Porém, era difícil distinguir o movimento dos íons ativamente transportados daqueles passivamente transportados pelo epitélio (SILVA, 2014).

Para resolver o problema, Ussing separou as duas câmaras com pele de rã dissecada, cada uma preenchida com o mesmo volume de uma solução eletrolítica. Como a concentração transepitelial e os gradientes osmóticos e hidrostáticos eram eliminados, o transporte paracelular de íons era dirigido por forças passivas. O transporte passivo criado pelo potencial elétrico espontâneo através do epitélio era totalmente eliminado com um pequeno circuito externo, que promovia corrente elétrica no epitélio (SILVA, 2014). Dessa forma, a permeabilidade é medida pela diferença de tensão gerada pelo aparecimento da substância do lado seroso e desaparecimento do lado mucoso da membrana biológica (BALIMANE et al., 2006).

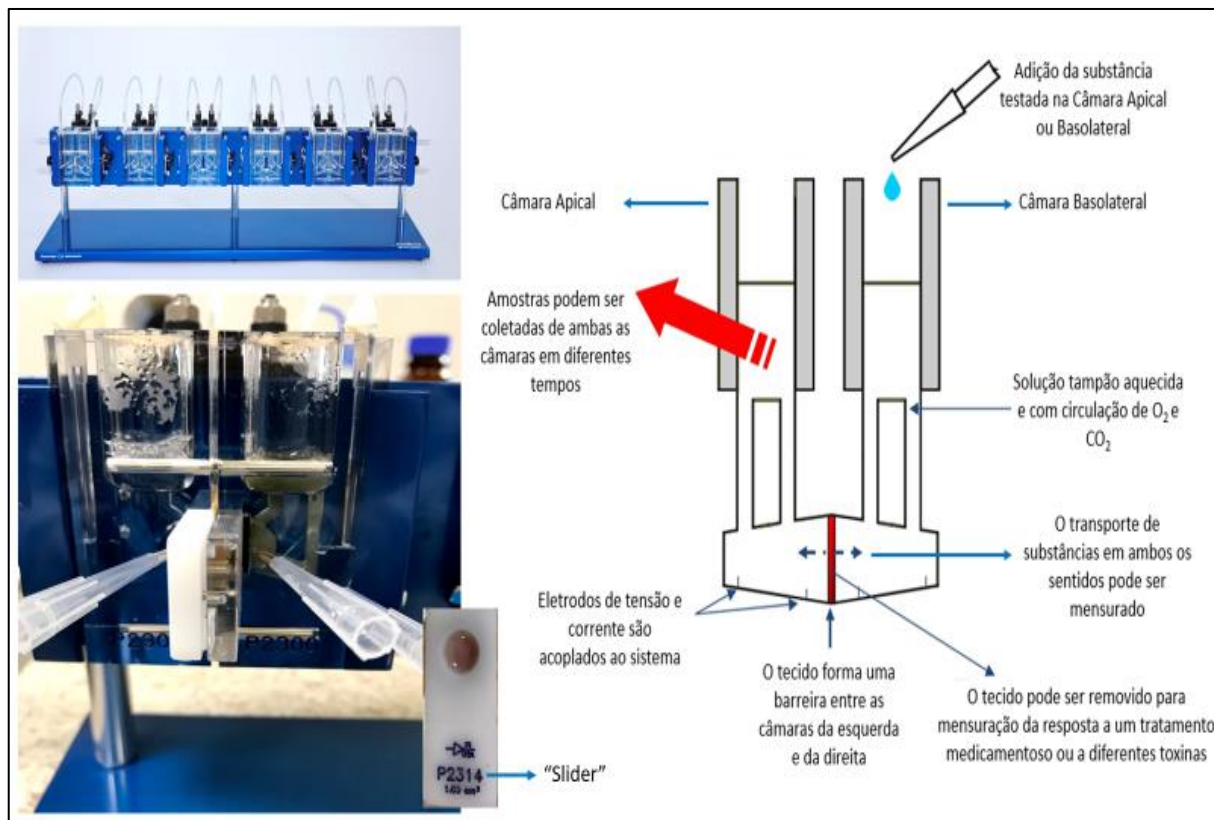
Esse sistema evoluiu gradualmente e novas utilidades para o equipamento foram aperfeiçoadas. Atualmente, as câmaras de Ussing são utilizadas para três finalidades principais: 1) investigar o papel dos canais iônicos na fisiologia e farmacologia da mucosa; 2) investigar absorção, transporte e metabolismo de drogas em um tecido intacto; e 3) investigar as alterações induzidas por substâncias no tecido ou seu efeito na liberação de mediadores (HE et al., 2013). A capacidade de manter o tecido em avaliação vivo, em um ambiente controlado e próximo do padrão fisiológico por algumas horas, levou os cientistas a usarem essa técnica para estudar a permeabilidade do tecido intestinal a várias moléculas, incluindo íons (HOLTUG et al., 1996), nutrientes (ALEXANDER; CAREY, 1999), drogas (LAMPEN et al., 1998), pequenas moléculas (HAYDEN; CAREY, 2000) e macromoléculas (AWAD et al.,

2007). Isso pode ser executado de forma relativamente simples, adicionando o composto marcado em um lado da câmara e amostrando a solução no outro lado para determinar a permeabilidade do tecido a esse composto.

A câmara de Ussing é geralmente composta por duas meias câmaras e um sistema de perfusão e, se necessário, um amplificador e sistema de aquisição de dados. O coração do sistema está na câmara, sendo que os outros componentes desempenham funções de suporte. O design original da câmara está em uso até hoje. No entanto, vários projetos mais modernos estão disponíveis e são otimizados por conveniência e para realizar medições mais específicas. A câmara é projetada para suportar uma membrana epitelial ou uma monocamada de células de tal maneira que cada lado do tecido é isolado e apenas tem contato com uma metade da câmara. As duas metades da câmara são então preenchidas com uma solução fisiologicamente relevante, como a de Ringer. Essa configuração permite que o pesquisador faça ajustes químicos e elétricos exclusivos em ambos os lados da membrana, havendo controle total do ambiente (WESTERHOUT et al., 2014).

As câmaras atualmente disponíveis no mercado são fabricadas em acrílico sólido em duas metades e têm portas verticais e horizontais em cada metade para conexão ao sistema de circulação e conexões elétricas. A face de uma das metades é embutida com pinos de aço inoxidável afiados que se encaixam com os orifícios correspondentes na outra meia face da câmara; ainda, existe a possibilidade de encaixar um *slider* entre as duas câmaras, onde o tecido é previamente fixado nos pinos. Esses pinos permitem a punção e posicionamento de uma membrana epitelial dentro da câmara. Cada metade da câmara também possui uma entrada de gás separada para acionar o sistema de circulação. O gás utilizado é geralmente uma mistura de 95% de O₂ e 5% de CO₂, e é forçado sob baixa pressão pelas entradas, permitindo o contato com a solução tampão. As bolhas ascendentes dirigem a circulação e oxigenam o tecido em avaliação (WESTERHOUT et al., 2014). A Figura 1 apresenta um esquema simplificado do funcionamento de câmaras de Ussing.

Figura 1 – Esquema simplificado do funcionamento de câmaras de Ussing empregadas para avaliação *ex vivo* do transporte de substâncias em diversos tecidos.



Fonte: (O Autor, 2021).

O transporte de compostos através da barreira intestinal ocorre por diferentes mecanismos. A via de transporte e a velocidade de absorção desses compostos são influenciadas por diferentes aspectos relacionados a fatores fisiológicos do tecido (p. ex., composição e espessura da camada de muco, permeabilidade da membrana e área de superfície), fatores físico-químicos do composto (p. ex., solubilidade em água, peso molecular, carga e hidrofobicidade) e fatores de formulação (p. ex., matriz alimentar) (DEFERME et al., 2008). Em geral, os compostos são transportados através de um dos seguintes mecanismos: 1) paracelular (pequenos compostos hidrofílicos e polares); 2) transcelular - transporte passivo (compostos lipofílicos), endocitose (proteínas) e transporte ativo mediado por transportador (glicose e aminoácidos); e 3) transporte mediado por células (RANDALL et al., 2011).

Uma limitação importante do uso de segmentos de tecido intestinal *ex vivo* é a limitada viabilidade do tecido. Estudos utilizando tecido humano e de ratos mostraram que o tecido intestinal permanece viável apenas por até 150 min (em média 120 min);

esse período foi longo o suficiente para estudar absorção e/ou secreção de hormônios da saciedade, porém muito curto para qualquer resposta fisiológica, como a liberação de citocinas e quebra reversível de junções de oclusão (HASLAM et al., 2011; ROZEHNAL et al., 2012; SJÖBERG et al., 2013).

Em um estudo com frangos de corte, Awad et al. (2011) avaliaram o efeito de deoxinivalenol (DON) sobre o transporte de glicose pela mucosa intestinal. Utilizando câmaras de Ussing, os autores comprovaram que a micotoxina reduziu a expressão de transportadores de glicose e, conseqüentemente, diminuiu sua passagem pelo intestino. Além disso, após o consumo de DON por 5 semanas, houve alterações na morfologia do intestino delgado, como redução do comprimento das vilosidades e da área de superfície de absorção intestinal. Garbetta et al. (2015) também utilizaram câmaras de Ussing com a finalidade de demonstrar o efeito da fumonisina (FUM) no aumento da peroxidação lipídica em explantes intestinais de ratos.

Como o sistema de câmaras de Ussing utiliza segmentos de tecido intestinal, estes ainda contêm as características morfológicas e fisiológicas naturais do órgão, incluindo a interação de muitos processos complexos entre o ambiente multicelular (ROZEHNAL et al., 2012). Dessa forma, a análise *ex vivo* proporciona uma melhor representação da morfologia complexa do organismo vivo, aprimorando a reprodução dos vários processos possíveis que ocorrem *in vivo*. Além disso, segmentos de tecido intestinal *ex vivo* de diferentes regiões do intestino delgado e grosso permitem a investigação da absorção regional e respostas imunes, o que não é possível quando se utilizam modelos de cultura celular única (RANDALL et al., 2011).

Porém, o sistema de câmara de Ussing não é, até hoje, amplamente aplicado para a investigação do impacto de bioativos alimentares e toxinas. Isso indica que ainda é possível fazer extensa pesquisa nesse campo.

2.2 TÉCNICAS DE ESTUDO *EX VIVO*

O modelo *ex vivo* é conhecido desde a década de 30; no entanto, em decorrência de aspectos éticos e legais, foi redescoberto nos últimos anos como técnica prática e eficaz. Explantes de diferentes tecidos de suínos e aves têm sido utilizados na experimentação animal. As finalidades são tão diversas como a ciência: avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas, carcinogênicas, terapêuticas, agentes biológicos ou testes de sensibilidade (BASSO; BRACARENSE, 2013).

A técnica *ex vivo* permite a produção de múltiplos explantes a partir de um único doador, o que reduz o número de animais utilizados em pesquisa; também há controle ambiental ainda maior para experimentação *in vitro* em comparação com o modelo *in vivo*. A exposição direta do tecido-alvo a doses definidas das substâncias de interesse e a comparação de amostras tratadas e controles provenientes de um único doador permitem a obtenção de resultados confiáveis (BASSO; BRACARENSE, 2013; RANDALL et al., 2011).

Esse método possibilita estudar a morfologia dos órgãos analisados, o que o torna propício para avaliar substâncias tóxicas, xenobióticos e patógenos. Além disso, o uso de animais na experimentação científica tem sido constantemente questionado pela sociedade, a qual exige maior controle e redução no uso de animais para essa finalidade. Nesse sentido, o modelo *ex vivo* também atende à questão bioética, além dos requisitos técnicos (BASSO; BRACARENSE, 2013). Segundo Schnaider e Souza (2003), as leis que regem o uso de animais em pesquisa preveem que todo estudo deve ser planejado de maneira a obter o maior número de informações utilizando o menor número possível de animais.

Modelos *ex vivo* também já foram utilizados para avaliar o impacto das micotoxinas sobre a integridade intestinal de suínos através de análises de alterações histológicas, imunológicas e imunohistoquímicas (KOLF-CLAUW et al., 2009; BRACARENSE et al., 2012). A expressão de proteínas que compõem as vias de sinalização celular também foi analisada nesse modelo (LUCIOLI et al., 2013). As técnicas de estudo utilizando explantes permitem avaliar os efeitos de associações de diferentes substâncias e patógenos sobre a mucosa intestinal. Em se tratando de micotoxinas, há a possibilidade de analisar multi-contaminações e diversos níveis de intoxicação, que são de complexa execução *in vivo*.

Maresca et al. (2018) descreveram os diferentes sistemas atualmente utilizados para avaliar os efeitos de drogas e diversos contaminantes nas funções intestinais, comparando suas vantagens e limitações. Os autores incluíram na revisão estudos utilizando cultura celular, explantes e organoides. O trabalho relata que a técnica de explantes contém todos os tipos de células e proporções normalmente presentes no epitélio e permite submeter fragmentos de órgãos do mesmo doador a diversos tratamentos, além de possibilitar o controle das condições ambientais às quais o tecido é submetido. Apesar dos diversos usos, as maiores limitações da técnica de explantes são a viabilidade celular dos tecidos em relação ao tempo após a morte do

animal e a alta variabilidade devido a diferenças individuais de resposta a toxinas. Além disso, o acesso ao lado mucoso intestinal só é possível quando o intestino é montado em câmaras de Ussing (MARESCA et al., 2018).

2.3 CÂMARAS DE USSING PARA ANÁLISES DE INTESTINO *EX VIVO*

A saúde intestinal é uma noção altamente complexa que abrange as diversas funções do trato gastrointestinal (TGI), incluindo absorção, secreção, barreira e imunidade. O TGI é a primeira barreira física contra agentes patogênicos e substâncias tóxicas; é também a principal via de absorção de nutrientes, água e medicamentos para o corpo, sendo fundamental para o desenvolvimento e manutenção do organismo vivo (GHAREEB et al., 2015).

Por ser quase impossível investigar muitas dessas funções inequivocamente *in vivo*, pesquisadores têm desenvolvido um conjunto de ferramentas complementares para avaliar vários aspectos da função intestinal: permeabilidade *in vivo*, alças isoladas (sem ou com excisão), tecidos montados em câmaras de Ussing, explantes de tecidos e cultivos de células epiteliais. Tais técnicas permitem verificar as propriedades eletrofisiológicas do intestino, a capacidade de absorção e de secreção e a permeabilidade a moléculas genéricas ou específicas de tamanhos variados; também são avaliados parâmetros endócrinos, nervosos e imunológicos presentes no tecido. As técnicas *ex vivo* ou *in vitro* podem ser usadas como dispositivos de triagem ou na investigação de mecanismos que poderiam contribuir para explicar os resultados obtidos *in vivo* (RANDALL et al., 2011).

Para a realização da técnica *ex vivo* utilizando as câmaras de Ussing, o segmento intestinal é montado formando uma barreira entre as câmaras; um lado é exposto à solução tampão contendo o composto de interesse (p. ex., mucosa) e o outro (p. ex., serosa) é exposto somente à solução tampão – sem composto (SMITH et al. 1992).

O sistema de avaliação de segmentos intestinais em câmaras de Ussing oferece vantagens em relação ao modelo *in vitro*, uma vez que mantém as relações dos tecidos e os padrões complexos de diferenciação observados *in vivo*. Nesse sistema, todos os tipos de células normalmente presentes no órgão são preservados e a arquitetura do tecido é mantida. Além disso, o ambiente para manipulação experimental é mais controlado quando comparado àquele de modelos *in vivo*, e

existe a possibilidade de obtenção de múltiplos explantes de um único doador. No entanto, os resultados encontrados devem ser confrontados com dados obtidos *in vivo* sempre que possível a fim de validar a coerência das abordagens e o significado biológico desse conjunto de informações (RANDALL et al., 2011).

Com relação às micotoxinas, vários autores mostraram interesse nos mecanismos celulares e na toxicidade celular em resposta à exposição às mesmas, inclusive utilizando câmaras de Ussing. O epitélio intestinal é a primeira barreira de defesa do hospedeiro após a ingestão desses contaminantes. Embora essas sejam as primeiras células expostas às micotoxinas e em doses mais altas, estudos sobre o efeito isolado ou combinado das diversas micotoxinas no TGI são escassos. Contudo, avanços substanciais têm sido obtidos (BOUHET; OSWALD, 2005).

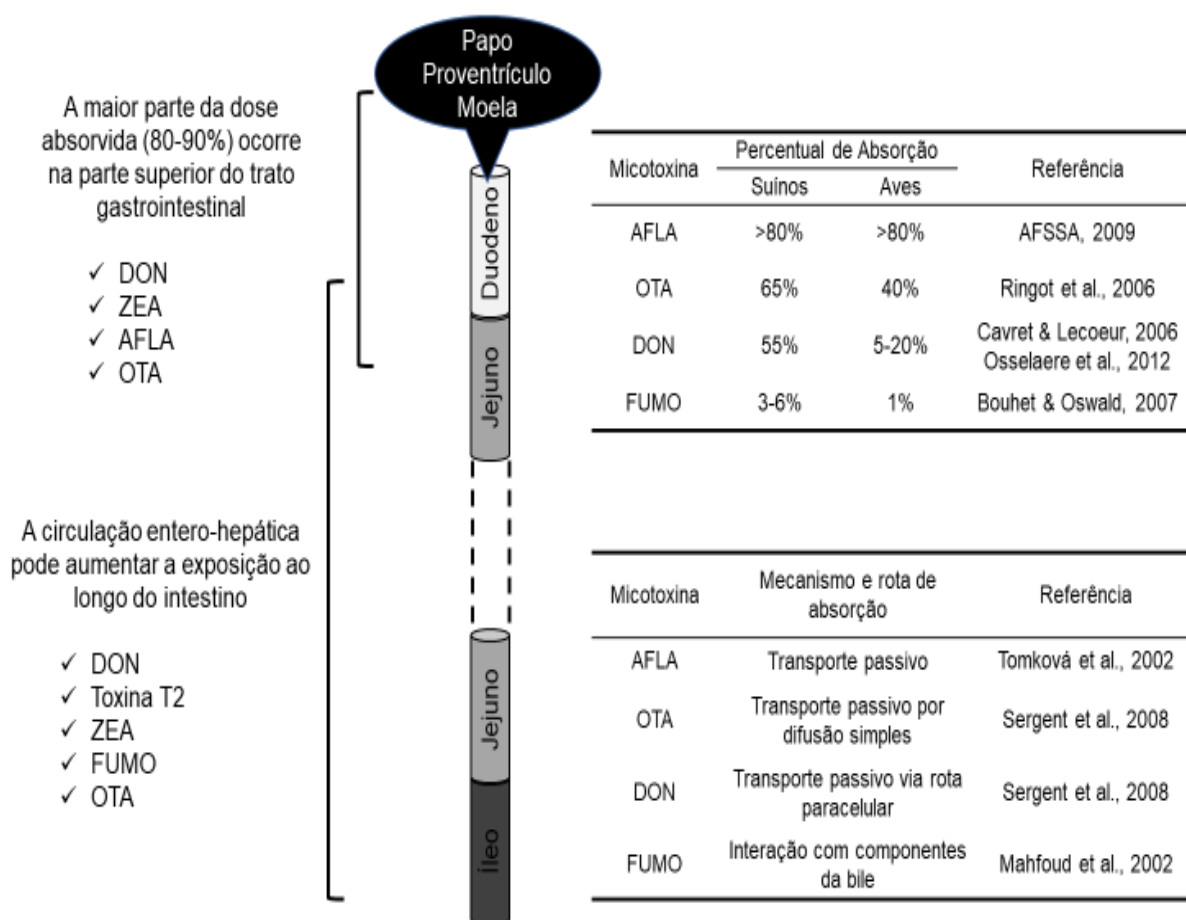
Em uma meta análise, Grenier e Appelgate (2013) sintetizaram o impacto da exposição às principais micotoxinas sobre as diversas funções intestinais. Com base em mais de 100 publicações, incluindo estudos *ex vivo*, os autores descreveram que as micotoxinas, em particular o DON, podem comprometer funções intestinais como digestão, absorção, permeabilidade, defesa e microbiota, resultando em piora na produtividade e saúde dos animais.

Os autores também relataram que mais de 80% da aflatoxina (AFLA) ingerida é absorvida no TGI de aves e suínos, enquanto a absorção de outras micotoxinas pode variar de 1 a 65%, conforme toxina e espécie (Figura 2). Além disso, várias micotoxinas são submetidas à circulação entero-hepática, o que as torna novamente disponíveis através da bile no intestino, resultando em reabsorção e prolongado tempo de exposição do TGI às mesmas (GRENIER; APPELGATE, 2013).

2.4 IMPACTO DAS MICOTOXINAS NA SANIDADE AVÍCOLA

A avaliação de risco da exposição a micotoxinas foi inicialmente direcionada a seus efeitos mutagênicos e carcinogênicos e ao impacto negativo sobre a produtividade das aves. Porém, há uma crescente compreensão dos efeitos adversos de várias micotoxinas sobre o sistema imunológico (OSWALD et al., 2005) e sobre o comprometimento da integridade intestinal das aves (GRENIER; APPELGATE, 2013). Esses efeitos levam a um desequilíbrio dos sistemas de defesa do animal, aumentando a susceptibilidade a doenças infecciosas ou agravando enfermidades já existentes.

Figura 2 – Absorção das principais micotoxinas no trato gastrointestinal (TGI) de aves e suínos.



À esquerda são exibidos os diferentes segmentos do TGI, os locais de absorção e a dinâmica das principais micotoxinas dentro do TGI. É uma representação aproximada do TGI e não leva em consideração o tamanho e a proporção desses segmentos de acordo com as espécies. À direita está indicada a porcentagem absorvida das principais micotoxinas dentro do TGI de suínos e de aves e as rotas de absorção das micotoxinas.

Fonte: (Adaptado de GRENIER; APPELGATE, 2013).

Análises em amostras de grãos e rações em todo o mundo demonstraram que, embora seja possível detectar concentrações extremamente altas de micotoxinas, na maioria dos casos a contaminação é baixa e geralmente contém mais de uma micotoxina (STREIT et al., 2012). Casos agudos decorrentes da ingestão de altos níveis podem resultar em mortalidade e perda acentuada na produtividade das aves. No entanto, a maioria dos casos refere-se a micotoxicoses crônicas causadas pela ingestão de baixos níveis, resultando em leve queda no desempenho e na ocorrência de alterações inespecíficas como imunossupressão (OSWALD et al., 2005).

Diferentemente dos patógenos, as micotoxinas não possuem propriedades imunogênicas e, portanto, não induzem resposta imune. Porém, são capazes de interferir em vias de sinalização envolvidas no crescimento celular, apoptose e respostas imunes. Como consequência, os processos que levam ao estabelecimento de uma resposta imune eficiente são prejudicados e tornam o animal mais suscetível à infecção (MURUGESAN et al., 2015).

A imunossupressão causada pelas micotoxinas resulta no aumento dos surtos de doenças, falhas na vacinação e baixos títulos de anticorpos (MURUGESAN, et al., 2015). Dados epidemiológicos indicam uma alta correlação entre os surtos da doença de Newcastle e a contaminação por AFLA nas rações de frangos de corte (YUNUS et al., 2011). A concentração reduzida de anticorpos observada em aves alimentadas com dietas contaminadas por AFLA está relacionada à depleção linfóide e inibição do desenvolvimento e maturação funcional da bursa de Fabricius. Frangos de corte expostos a DON via dieta também apresentaram menores títulos de anticorpos para vacinas comuns (doença de Newcastle e bronquite infecciosa das galinhas) e redução no tamanho da bursa de Fabricius (AWAD et al., 2013).

Antonissen et al. (2014a) revisaram o impacto dos tricotecenos sobre a susceptibilidade dos animais a doenças. De uma forma geral, os tricotecenos afetam negativamente a resposta imune do hospedeiro e aumentam a severidade de doenças como coccidiose, salmonelose, colibacilose e enterite necrótica, que possuem alta prevalência e causam grandes prejuízos para a avicultura brasileira e mundial.

2.5 IMPACTO DAS MICOTOXINAS NA INTEGRIDADE INTESTINAL

Após a ingestão de alimentos ou rações contaminadas, as células epiteliais intestinais podem ser expostas a altas concentrações de substâncias tóxicas, afetando potencialmente as funções intestinais (PINTON; OSWALD, 2014). A mucosa intestinal atua como uma barreira seletiva; por um lado, permite a absorção de nutrientes dietéticos, eletrólitos e água do lúmen intestinal para a circulação sistêmica e, por outro lado, impede a passagem de substâncias nocivas do ambiente externo para o organismo, incluindo antígenos estranhos, microrganismos e suas toxinas (WIJTEN et al., 2011).

A barreira gastrointestinal é dividida em componentes intrínsecos e extrínsecos, e ambos podem ser afetados negativamente pelas micotoxinas. A barreira intrínseca

é composta pelas células epiteliais que revestem o trato digestivo e as junções de oclusão que as unem. As micotoxinas prejudicam o componente intrínseco através de danos à integridade do epitélio intestinal e redução na renovação e reparo de células epiteliais (BOUHET; OSWALD, 2007; PINTON; OSWALD, 2014). Isso aumenta a suscetibilidade dos animais a doenças infecciosas como enterite necrótica induzida por *Clostridium perfringens* e coccidiose em frangos de corte (ANTONISSEN et al., 2014b; GRENIER et al., 2016) e *Salmonella typhimurium* e colibacilose em suínos (OSWALD et al., 2003; VANDENBROUCKE et al., 2011).

2.5.1 Deoxinivalenol

O exemplo mais relevante de uma micotoxina associada ao comprometimento da integridade intestinal é o DON. Estudos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* evidenciam que DON tem a capacidade de comprometer várias funções intestinais, como diminuir a área de superfície das vilosidades, interferir na modulação dos transportadores de nutrientes e aumentar a permeabilidade intestinal (AWAD et al., 2004; OSSELAERE et al., 2013; LESSARD et al., 2015). Extensas revisões bibliográficas descrevem a capacidade de DON e outros tricotecenos de causar lesões histopatológicas intestinais, promover o rompimento da barreira intestinal (impacto na adesão celular, permeabilidade, translocação bacteriana, proliferação e diferenciação celular) e modular a capacidade de resposta imune da mucosa intestinal; conseqüentemente, o animal se torna mais susceptível a doenças infecciosas entéricas (GRENIER; APPELGATE, 2013; PINTON; OSWALD, 2014; BROOM, 2015; GHAREEB et al., 2015; PIERRON et al., 2016).

Kolf-Clauw et al. (2009) foram os primeiros autores a desenvolver uma técnica de cultura de explantes intestinais de suínos e aplicar esse modelo para avaliar lesões histológicas causadas pela exposição a DON. As lesões histológicas induzidas por DON foram dependentes da dose utilizada e consistiam em enterócitos com núcleos picnóticos, vilosidades achatadas e coalescentes, edema e necrose na lâmina própria e grande número de células apoptóticas.

A partir desse trabalho, utilizando abordagens *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* em suínos, Pinton et al. (2009) avaliaram se doses de DON comumente vistas em alimentos contaminados poderiam afetar a função de barreira do intestino. Os autores concluíram que DON reduz a expressão de claudina, diminui a função de barreira do

epitélio intestinal e permite uma maior passagem de *Escherichia coli* pelos cultivos celulares. Nos mesmos moldes do estudo anterior, Pinton et al. (2012) avaliaram os efeitos de DON e seus derivados acetilados. DON, 3-acetildeoxinivalenol e 15-acetildeoxinivalenol (15-ADON) causaram danos ao epitélio intestinal, aumentaram a permeabilidade intestinal, reduziram a expressão de proteínas de oclusão e promoveram a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). O 15-ADON apresentou a maior toxicidade, o que foi atribuído à sua grande capacidade de ativar MAPK nos três modelos utilizados.

Posteriormente, Bracarense et al. (2012) observaram que DON também diminuiu a expressão de outras proteínas de junção, como ocludina e E-caderina, em intestino de leitões. Esse foi o primeiro relato da redução na expressão da E-caderina no TGI após a ingestão de uma dieta contaminada por micotoxinas. A redução na expressão dessas proteínas sugere perda de propriedades adesivas dos enterócitos com conseqüente aumento na translocação intestinal de antígenos luminiais, promovendo inflamação intestinal (MARESCA; FANTINI, 2010) e maior suscetibilidade a infecções entéricas (ANTONISSEN et al., 2014b).

Utilizando suínos, Pierron et al. (2018) demonstraram *in vivo* que DON prejudicou a morfologia do jejuno e do íleo, reduziu a altura das vilosidades, diminuiu a expressão da E-caderina e modificou a expressão intestinal de citocinas, em contraste com de-epoxi-deoxinivalenol, que induziu somente mínimos efeitos de toxicidade intestinal. Já Alassane-Kpembé et al. (2017) empregaram um modelo *ex vivo* com segmentos de jejuno de suínos e observaram que doses muito baixas de DON e nivalenol (NIV) aumentam significativamente a expressão de genes inflamatórios no intestino; os autores também verificaram que a atividade pró-inflamatória combinada de DON e NIV é sinérgica. Isso reforça que a associação de micotoxinas deve ser levada em consideração para o estabelecimento de limites mais sensíveis e padrões combinados de exposição.

Conforme relatado acima, a grande maioria dos estudos tem sido desenvolvida em suínos, provavelmente devido à maior sensibilidade desta espécie a DON, maior proximidade com o sistema digestivo humano e maior facilidade em realizar trabalhos *ex vivo* (KOLF-CLAUW et al., 2009). Em frangos de corte, o efeito de DON sobre o intestino delgado e o fígado foi avaliado *in vivo* e, pela primeira vez, o impacto dessa micotoxina no estresse oxidativo e na resposta inflamatória foi demonstrado na espécie (OSSELAERE et al. 2013). A investigação também indicou que DON reduziu

a altura das vilosidades, a profundidade das criptas e a expressão de proteínas de oclusão no jejuno e íleo. Assim, o estudo comprovou que a exposição crônica de frangos de corte a DON pode levar a um aumento na permeabilidade intestinal e desencadear uma inflamação intestinal crônica e maior susceptibilidade a infecções.

Em um interessante estudo utilizando infecção experimental por *C. perfringens*, frangos de corte alimentados com uma dieta contaminada com 5 mg de DON/kg de ração foram mais propensos a desenvolver lesões de enterite necrótica em comparação aos animais alimentados com uma dieta controle (ANTONISSEN et al., 2014b). Nesse caso, DON agiu como um fator predisponente ao danificar a mucosa intestinal, aumentando a passagem de nutrientes para o lúmen intestinal e fornecendo o substrato necessário para a proliferação bacteriana.

Os primeiros estudos sobre as propriedades eletrofisiológicas da mucosa intestinal de aves e do transporte de glicose, após exposição a DON, utilizaram fragmentos de jejuno isolados em câmaras de Ussing (AWAD et al., 2004; AWAD et al., 2005; AWAD et al., 2007; YUNUS et al., 2012). Posteriormente, Awad e Zentek (2015) confirmaram e ampliaram os estudos dos efeitos de DON sobre a permeabilidade intestinal de frangos de corte; segmentos intestinais montados em câmaras de Ussing foram expostos a DON e à cicloheximida, um inibidor da síntese de proteínas em eucariotos. A investigação concluiu que os defeitos na diferenciação e o aumento na permeabilidade das células intestinais causados por DON resultaram, principalmente, de sua ação inibitória sob a síntese de proteínas. Dessa forma, além de afetar as funções de barreira do intestino, DON também pode prejudicar as funções imunológicas, uma vez que a redução na síntese proteica aumenta a susceptibilidade a doenças.

2.5.2 Fumonisina

O comprometimento da integridade da barreira intestinal induzida pela FUM também já foi demonstrado em diferentes tipos de estudos. Em experimentos *in vitro*, Bouhet et al. (2004) avaliaram o efeito da fumonisina B₁ (FUM B₁) sobre uma linhagem celular epitelial intestinal de suínos (IPEC-1); a toxina reduziu a resistência elétrica transepitelial (TEER) e bloqueou a proliferação de células intestinais. Também utilizando cultivos de IPEC-1, Bouhet et al. (2006) provaram que a FUM B₁ aumenta

a translocação de *E. coli* patogênica. Esse mesmo efeito já havia sido evidenciado por Oswald et al. (2003) através de intoxicação *in vivo* com FUM B₁.

Já em testes *ex vivo* utilizando explantes de intestino de suínos em câmaras de Ussing, Lallès et al. (2009) demonstraram um aumento na permeabilidade paracelular do intestino delgado após 2h de exposição à FUM B₁. O impacto dessa micotoxina sobre o epitélio intestinal também foi verificado *in vivo* utilizando suínos intoxicados com baixas doses (6 mg/kg de ração) durante 5 semanas (Bracarense et al., 2012). Observou-se o surgimento de lesões histológicas nas vilosidades, maior expressão de algumas citocinas pró-inflamatórias e redução na expressão de proteínas de adesão e oclusão.

O impacto da FUM sobre a integridade intestinal em aves ainda não está totalmente esclarecido. Apenas um trabalho relata o dano causado por FUM B₁ e FUM B₂ sobre os componentes extrínsecos da barreira intestinal, mais precisamente a produção de muco (ANTONISSEN et al., 2015). Dados sobre o impacto da FUM sobre proteínas de oclusão e outros componentes intrínsecos da barreira intestinal ainda precisam ser melhor elucidados nessa espécie.

2.5.3 Aflatoxina

Com relação à AFLA, a maioria dos trabalhos se concentram na avaliação de sua hepatotoxicidade e poder carcinogênico. Apenas poucos estudos verificaram o efeito da exposição à AFLA sobre a permeabilidade intestinal. Uma avaliação *in vitro* utilizando segmentos de intestino de frangos de corte em câmaras de Ussing demonstrou que a aflatoxina B₁ (AFB₁) só pode afetar moderadamente a permeabilidade durante uma exposição aguda (YUNUS et al., 2010). Garcia et al. (2007) investigaram o efeito da AFB₁ e FUM B₁ sobre uma linhagem celular epitelial intestinal de suínos e verificaram uma sinergia entre as toxinas, afetando a função da barreira intestinal. Os efeitos observados foram sobre a proliferação celular, dano celular e síntese de interleucina-8; porém, a AFB₁ sozinha afetou somente as características morfológicas das células. Outra investigação revelou que a diminuição da TEER em células Caco-2 expostas à AFB₁ é acompanhada por uma diminuição na síntese de proteínas de oclusão (ROMERO et al., 2016).

Por outro lado, modelos *in vivo* indicam resultados contraditórios. Galarza-Seeber et al. (2016) observaram que a AFB₁ não aumenta a permeabilidade do

intestino em frangos de corte, e Chen et al. (2016) mostraram claramente que AFB₁ altera a função da barreira intestinal desses animais, sem afetar a altura das vilosidades e a profundidade das criptas. Em ratos, Wang et al. (2016) analisaram a microbiota fecal de animais alimentados com doses crescentes de AFB₁. Os achados sugerem que a toxina pode modificar a microbiota intestinal de maneira dose-dependente, já que doses crescentes diminuíram a diversidade da microbiota e aumentaram a uniformidade da composição bacteriana fecal.

Portanto, apesar de muitos anos de sucessivas pesquisas sobre os efeitos deletérios da AFLA sobre as aves, a literatura disponível ainda não é conclusiva com relação ao seu impacto sobre o TGI. Além disso, há evidências de que o TGI de aves pode se adaptar a um desafio crônico com essa toxina através de mecanismos ainda não elucidados (YUNUS et al., 2011).

2.6 ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS

Estratégias que incluem medidas preventivas em pré e pós-colheita têm sido desenvolvidas para minimizar a ocorrência das micotoxinas na alimentação animal, tais como boas práticas agrícolas e de armazenamento. Essas ações são consideradas a melhor maneira de controlar a contaminação por micotoxinas; no entanto, a adoção de boas práticas pode não evitar ou eliminar completamente a ocorrência dessas toxinas na cadeia alimentar (DI GREGORIO et al., 2014). Além disso, o uso de métodos físicos e químicos para descontaminar produtos agrícolas que apresentam micotoxinas é restrito por questões de segurança, possíveis perdas na qualidade nutricional das matérias-primas, eficácia limitada e custo (EC, 2009; KOLOSOVA; STROKA, 2011).

Nesse contexto, a inclusão de agentes detoxificantes na dieta destaca-se entre as estratégias para reduzir a exposição de aves às micotoxinas (PHILLIPS et al., 2008). A Portaria nº 130 de 24 de maio de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) sugeriu a substituição do termo “adsorvente de micotoxinas” pela denominação geral “aditivos antimicotoxinas”; esta inclui os produtos que, adicionados ao alimento para animais, são capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar as micotoxinas (BRASIL, 2006). Em 2009, a União Europeia aprovou o uso de agentes detoxificantes de micotoxinas, incluindo como um novo grupo de aditivos alimentares definido como “substâncias que podem suprimir ou

reduzir a absorção, promover a excreção de micotoxinas ou modificar seu modo de ação” e, em consequência, diminuem a distribuição destas pelo sangue e órgãos-alvo (EC, 2009).

Os AAMs apresentam diferentes mecanismos de ação; as micotoxinas podem se ligar à superfície do agente (adsorção) ou sofrer degradação ou transformação em metabólitos menos tóxicos (biotransformação). A maioria desses produtos exerce um efeito de adsorção no TGI do animal, unindo-se de forma eficaz às micotoxinas, as quais serão eliminadas pelas fezes; assim, seus efeitos negativos sobre o organismo são evitados (WIELOGÓRSKA et al., 2016).

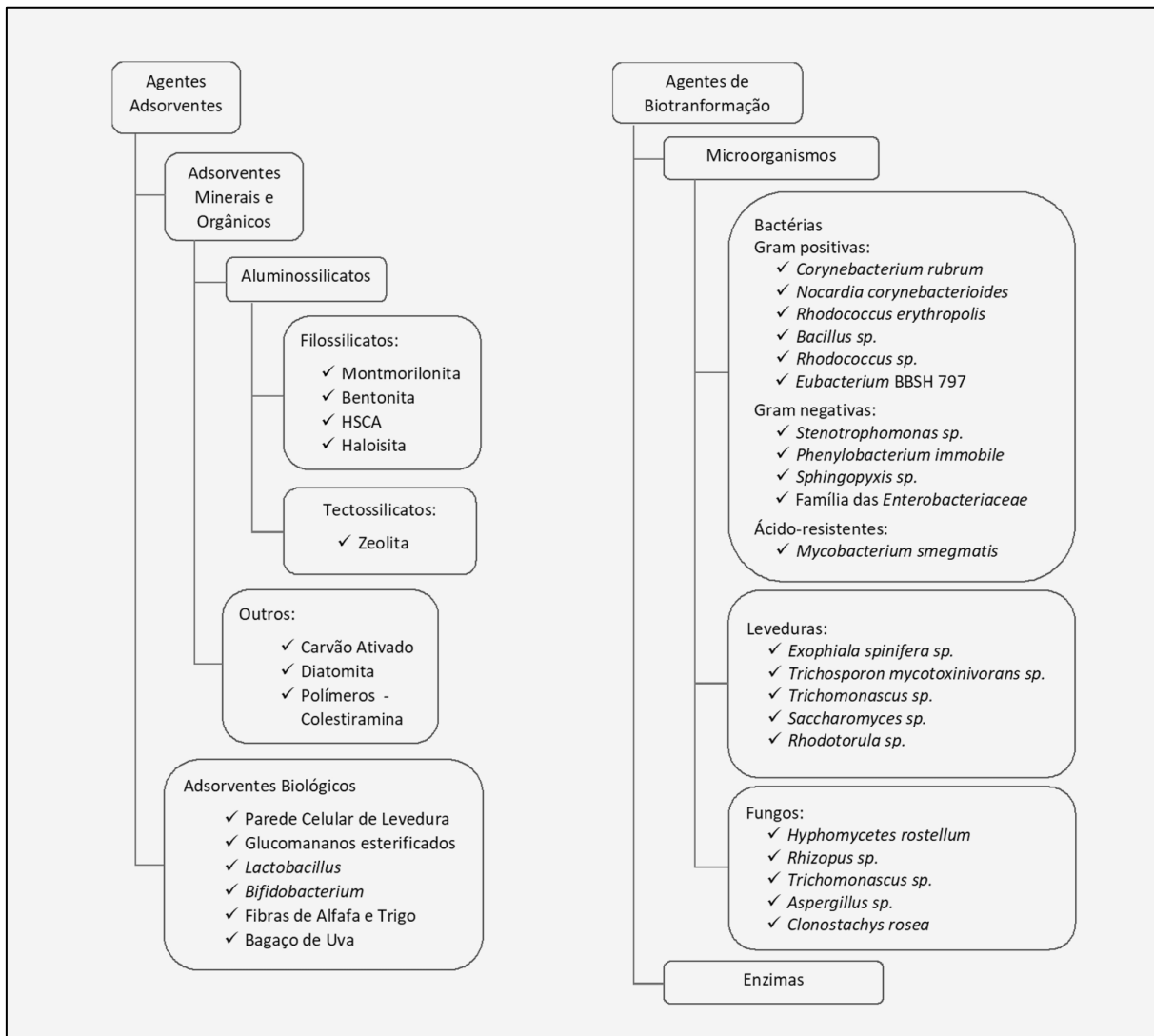
Paralelamente ao estabelecimento dos AAMs como um novo grupo funcional de aditivos para a alimentação animal (EC, 2009), a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) publicou uma extensa revisão sobre os principais agentes detoxificantes de micotoxinas utilizados nas rações, abrangendo aspectos como modo de ação, eficácia e segurança alimentar (BOUDERGUE et al., 2009). Desde então, diversos estudos foram publicados sobre a eficácia dos agentes adsorventes (AAs) (NESIC et al., 2008; SANTOS et al., 2011; MAGNOLI et al., 2011; WANG et al., 2012; NEEFF et al., 2013; DI GREGORIO et al., 2014); no entanto, a maioria refere-se à eficácia da adsorção de uma micotoxina específica, geralmente testada em níveis altos, o que é raramente encontrado a campo.

A contaminação com múltiplas micotoxinas é um assunto de grande preocupação. A detecção frequente de co-ocorrência de micotoxinas, mesmo em estudos de triagem de um número limitado de analitos, enfatiza a importância das estratégias voltadas ao uso de adsorventes com multi-composição, capazes de sequestrar uma gama mais ampla de micotoxinas (VILA-DONAT et al., 2018). No entanto, com relação a escolha do melhor AAM, não existe produto 100% eficiente para todas as micotoxinas. Antes de escolher um produto, é importante definir qual (ou quais) toxina objetiva-se controlar, entendendo as características de sua molécula química e como ela interage com os diversos produtos disponíveis no mercado.

Dados publicados até o momento indicam que os adsorventes inorgânicos, como os aluminossilicatos [bentonitas, aluminossilicatos de cálcio e sódio hidratados (HSCAS) e zeolitas], apresentam extrema eficácia contra a AFLA. No entanto, sua eficácia é limitada frente a outras micotoxinas, como os tricotecenos. Somente alguns adsorventes inorgânicos, como a bentonita e a zeolita, parecem capazes de adsorver parcialmente a zearalenona (ZEA). Por outro lado, as argilas modificadas têm se

mostrado mais eficazes na adsorção de FUM, ocratoxina A (OTA) e ZEA do que as não modificadas. Além disso, há evidência de que os adsorventes orgânicos [parede celular de leveduras (YCW) e glucomananos esterificados] são mais eficazes na ligação a um espectro mais amplo de micotoxinas (ZEA, OTA, FUM). Quanto ao DON, apenas YCW, carvão ativado ou polímeros sintéticos (colestiramina) foram identificados como potenciais adsorventes (VILA-DONAT et al., 2018). A Figura 3 apresenta os grupos dos principais tipos de AAMs disponíveis atualmente ou em fase de testes.

Figura 1 – Principais grupos de aditivos antimicotoxinas sob avaliação ou disponíveis comercialmente.



Fonte: (Adaptado de WIELOGÓRSKA et al., 2016).

2.6.1 Agentes Adsorventes

Adsorventes são compostos que possuem a habilidade de se ligar às micotoxinas, limitando sua biodisponibilidade e diminuindo a exposição do animal às mesmas. As micotoxinas podem se ligar aos AAs por diferentes tipos de interações, como ligação hidrofóbica, ligações de hidrogênio e atração ou repulsão eletrostática (DI GREGORIO et al., 2014). Dessa forma, o complexo formado entre a micotoxina e o agente passa através do TGI do animal e é eliminado nas fezes. Esse complexo deve ser estável ao longo do TGI, de modo que a ligação não seja rompida conforme as variações de pH. As propriedades físico-químicas (polaridade, solubilidade e forma) correspondem aos parâmetros cruciais a serem avaliados para evitar a dessorção da toxina (AVANTAGGIATO et al., 2005; KABAK et al., 2006).

Atualmente, esse tipo de AAM divide-se em três grupos distintos: compostos inorgânicos (HSCAS, bentonitas, zeolitas), orgânicos (à base de YCW, bactérias ácido-láticas, fibras micronizadas, biossorventes e carvão ativado) e sintéticos (argilas modificadas e polímeros) (DI GREGORIO et al., 2014).

Os aluminossilicatos constituem o grupo mais abundante de minerais formadores de rochas. Os estudos sobre a mitigação do efeito das micotoxinas em animais envolvendo AAs concentram-se principalmente nesses compostos. Muitos trabalhos revisaram a inativação de micotoxinas por aluminossilicato, sendo que a maioria demonstra que os AAs parecem se ligar a apenas um grupo limitado de micotoxinas, indicando muito pouca ou nenhuma ligação a outras (KABAK et al., 2006; JOUANY, 2007; KONG et al., 2014). Além disso, deve-se considerar que os AAs podem adsorver micronutrientes e causar efeitos negativos sobre a biodisponibilidade de minerais (KOLOSVA; STROKA, 2011), e que há o risco de as argilas naturais estarem contaminadas com dioxinas e metais (JOUANY, 2007).

Os HSCAS estão entre os AAs mais comumente utilizados para mitigar os efeitos da AFLA, visto que possuem uma forte e seletiva afinidade pela mesma (HARPER et al., 2010). As bentonitas são argilas filossilicadas com uma microestrutura cristalina em camadas de composição variável. Elas são frequentemente referidas como esmectitas, pois é a argila mineral dominante. A grande área de superfície e a alta capacidade de troca de cátions tornam o grupo esmectita capaz de adsorver substâncias orgânicas pela penetração tanto dos cátions quanto das moléculas polares. Bentonitas demonstraram uma grande eficácia na

adsorção de micotoxinas, especificamente AFLA (KONG et al., 2014) e outras (ZEA, OTA e FUM), em estudos *in vitro* e *in vivo* (AVANTAGGIATO et al., 2005; WANG et al., 2012).

Já as zeolitas têm uma grande superfície interna, associada à sua elevada capacidade de troca de cátions e à adsorção de moléculas polares (DI GREGORIO et al., 2014). Há evidência de que a zeolita tem a capacidade de adsorver AFLA e outras micotoxinas, como a FUM, porém os resultados são pouco animadores (DAKOVIC et al., 2010). Diante da relativa ineficácia dos adsorventes inorgânicos em relação às micotoxinas, com exceção da AFLA, foram propostos os adsorventes orgânicos naturais (AVANTAGGIATO et al., 2014).

Saccharomyces cerevisiae (SC) ocorre como parte de populações microbianas naturais em alimentos e é usado como cultura inicial em alimentos fermentados e bebidas. Extraída de SC, a YCW consiste principalmente em proteínas, lipídios e polissacarídeos, sendo os glucanos e mananos os dois principais constituintes da última fração. A YCW exibe uma grande variedade de áreas capazes de adsorção, bem como diferentes mecanismos de ligação (ligações de hidrogênio, interações iônicas ou hidrofóbicas) com as micotoxinas (RINGOT et al., 2007). A YCW mostrou capacidade de ligação com um espectro muito mais amplo de micotoxinas (ZEA, OTA, FUM e DON) (FAUCET-MARQUIS et al., 2014; CAVRET et al., 2010) quando comparado aos agentes inorgânicos. Além da YCW, os glucomanos esterificados extraídos da parede celular de SC também se mostraram eficazes em neutralizar os efeitos tóxicos de diferentes micotoxinas submetidas ao animal, inclusive com utilização de mais toxinas simultaneamente (LI et al., 2012; MOHAGHEGH et al., 2017).

Outros exemplos de compostos orgânicos são as bactérias ácido lácticas, normalmente encontradas em plantas em decomposição e produtos lácteos. Algumas estirpes de *Lactobacillus rhamnosus* podem se ligarem a certos compostos no intestino delgado (p. ex., AFLA e ZEA). Essas bactérias parecem mais eficientes em relação às toxinas não polares (p. ex., ZEA) devido à maior hidrofobicidade da superfície celular (KABAK et al., 2006).

Ainda dentro do grupo dos AAs orgânicos, o carvão ativado é um pó não solúvel produzido pela pirólise de diversos compostos orgânicos, seguido de sua ativação química ou física, visando o desenvolvimento de uma estrutura altamente porosa (VILA-DONAT et al., 2018). Apesar de o carvão ativado ser um adsorvente eficiente e

com alta afinidade para diferentes micotoxinas (incluindo DON) *in vitro*, sua eficácia *in vivo* não foi confirmada para diversas delas (AVANTAGGIATO et al., 2005). O carvão ativado também adsorveu vitaminas e minerais presentes na dieta e que são essenciais para o crescimento dos animais (VEKIRU et al., 2007).

As argilas modificadas e os polímeros estão incluídos no último grupo de AAs sintéticos. Os aluminossilicatos parecem ser seletivos na adsorção de AFLA, com pouco ou nenhum efeito benéfico contra as demais micotoxinas, sendo que essa limitação pode ser superada por modificações químicas. Tais modificações consistem em alterações nas propriedades de superfície, resultando em uma maior hidrofobicidade dos compostos (PAPAIOANNOU et al., 2005). Testes *in vitro* mostraram que a adição de argilas modificadas ao nível de 2% em amostras de milho permitiu uma redução de 70% na disponibilidade de FUM B₁ na solução (BAGLIERI et al., 2013); a adição de um nano composto de argila em uma solução de ZEA também foi capaz de adsorvê-la (FENG et al., 2008).

Um exemplo de polímero utilizado como agente adsorvente sintético é a colestiramina, uma resina de amônio quaternário insolúvel que se liga fortemente a vários compostos aniônicos. *In vitro*, a colestiramina provou ser um adsorvente eficaz para OTA, FUM e ZEA; *in vivo*, sua inclusão em até 2% na alimentação foi capaz de mitigar os efeitos tóxicos das micotoxinas (KOLOSOVA; STROKA, 2011). No entanto, o alto custo desses polímeros é atualmente um fator limitante para aplicações práticas nas rações animais.

2.6.2 Agentes de biotransformação

Os agentes de biotransformação (ABs) atuam degradando as micotoxinas em metabólitos não tóxicos para o animal. A biotransformação pode ser realizada por enzimas degradadoras de micotoxinas ou por microorganismos produtores de tais enzimas. Wielogórska et al. (2016) descreveram várias espécies microbianas, incluindo bactérias, leveduras e fungos, que têm sido reconhecidas por sua capacidade de biotransformar micotoxinas em metabólitos menos tóxicos por meio de diversas rotas metabólicas. Os principais microorganismos estudados foram listados anteriormente (Figura 3).

A levedura *Trichosporon micotoxinivorans* parece ser um dos microorganismos mais desenvolvidos para aplicação prática na detoxificação de OTA e ZEA

(SCHATZMAYR et al., 2003; VEKIRU et al., 2010). A aplicação dessa levedura em dietas de aves provou ser eficiente em biotransformar OTA e mitigar seus danos sobre as aves (POLITIS et al., 2005).

Vários microrganismos, principalmente bactérias aeróbicas e leveduras com propriedades de degradação, foram explorados e isolados com o objetivo de degradar a FUM em compostos não tóxicos (SCHATZMAYR et al., 2006). Por várias razões, nenhum desses microrganismos foi útil como um AAM para uso na alimentação dos animais. No entanto, a via catabólica de degradação da FUM foi estudada e o gene que codifica a enzima chave da sua detoxificação (FUMzyme) foi identificado, clonado e expresso em uma cepa de levedura (HEINL et al., 2010; HARTINGER; MOLL, 2011). Quando testada em suínos, a FUMzyme (carboxilesterase) degradou a FUM em um metabolito não tóxico (GRENIER et al., 2013), e posteriormente foi aprovada para uso comercial (EC, 2014).

Sendo uma das espécies mais estudadas, a cepa *Eubacterium* BBSH 797, isolada do rúmen de bovinos, promove degradação eficaz de DON e outros tricotecenos. Após testes *in vitro* e *in vivo*, foi introduzida no mercado como um AAM comercial denominado Mycofix® BBSH (Biomin, Getzersdorf, Áustria). Além disso, algumas das enzimas responsáveis pelas características de biotransformação reconhecidas nessas espécies microbianas foram isoladas e aplicadas diretamente como agentes desintoxicantes (BOUDERGUE et al., 2009).

Apesar dos diversos usos, a aplicação na prática de ABs nas dietas animais ainda é limitada. Isso se deve à falta de informação sobre os mecanismos de biotransformação, a toxicidade dos produtos derivados da biotransformação, o efeito das reações de transformação nos valores nutricionais dos alimentos e a segurança desses produtos em relação aos animais (WIELOGÓRSKA et al., 2016).

2.7 TESTES DE EFICÁCIA DE ADITIVOS ANTIMICOTOXINAS

Conforme mencionado anteriormente, há uma grande quantidade de AAs e ABs com capacidade de ligação a micotoxinas e/ou desintoxicação, e estes têm sido utilizados globalmente em rações para animais. No entanto, os regulamentos para AAMs ainda não foram implementados em muitas partes do mundo, o que impede a garantia da segurança e eficácia dos produtos para a cadeia produtiva. Por isso, é

importante que sejam criadas diretrizes a fim de comprovar a segurança e a eficácia de tais aditivos sob diferentes condições *in vitro* e *in vivo* (MURUGESAN et al., 2015).

Para superar essa situação legal insatisfatória, em 2010 a EFSA publicou orientações com requisitos rigorosos para avaliação de novos AAMs, como: a capacidade de ligação do produto com a micotoxina deve ser comprovada; os produtos de degradação de micotoxinas devem ser seguros para animais e consumidores; mínimo de três estudos *in vivo* com eficácia significativa na menor dose recomendada; biomarcadores relevantes de cada micotoxina devem ser usados para demonstrar a eficácia do produto; e comprovação da ausência de possíveis interações com nutrientes, coccidiostáticos ou medicamentos veterinários (EFSA, 2010).

Visando maior qualidade dos produtos disponíveis no mercado brasileiro, em 2006 o MAPA instituiu um grupo de trabalho (formado por integrantes do próprio ministério e pesquisadores brasileiros da área de micotoxicologia) sobre micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2006). O grupo elaborou uma recomendação contendo uma proposta de critérios para registro de um AAM. Dentre os aspectos abordados estão a constituição química e os testes capazes de qualificar e quantificar a eficácia de um AAM. Para serem considerados AAMs e entrarem no mercado, novos produtos devem passar por testes individuais rotineiros *in vitro* e *in vivo* a fim de garantir a sua segurança, eficácia e inocuidade em relação à saúde animal (BRASIL, 2006).

2.7.1 Testes *in vitro*

A metodologia utilizada na avaliação *in vitro* visa reproduzir em laboratório as condições que a micotoxina e o AAM encontram naturalmente no TGI. Para isso, são produzidas soluções que mimetizam as condições naturais do trato, como o suco gástrico, com pH 3, e o suco intestinal, com pH 6. Após adicionadas as concentrações conhecidas da micotoxina e do AAM de interesse, essas soluções são incubadas a temperaturas constantes e com agitações periódicas. Para mensurar a ação do AAM, as soluções são submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS/MS), a qual permite quantificar a porcentagem de micotoxina que foi adsorvida e/ou inativada pelo AAM (MALLMANN et al., 2006).

Em estudos *in vitro*, a eficácia do AAM parece depender principalmente das propriedades físico-químicas do adsorvente e da micotoxina, bem como do pH do

meio. Sendo a eficiência de ligação do adsorvente altamente afetada pela presença da matriz ou mesmo do suco gástrico, que pode diminuir seu desempenho em comparação aos resultados obtidos em solução tampão, a grande maioria dos estudos *in vitro* utiliza sucos biológicos artificiais ou modelos que mimetizam o TGI (VILA-DONAT et al., 2018).

Um modelo *in vitro* que mimetiza o TGI de suínos foi utilizado pela primeira vez por Avantaggiato et al. (2003) para avaliar o potencial do carvão ativado e da colestiramina em adsorver ZEA. Tal modelo, desenvolvido e patenteado por Minekus et al. (1995), consiste em quatro compartimentos em série, simulando estômago, duodeno, jejuno e íleo de suínos saudáveis. Utilizando preparações de secreções gástricas, biliares e pancreáticas e bicarbonato para controlar o pH dos compartimentos, um grupo de pesquisas italiano, liderado por Giuseppina Avantaggiato, demonstrou o poder de diversos AAMs em adsorver ou inativar diferentes micotoxinas (AVANTAGGIATO et al., 2003; AVANTAGGIATO et al., 2004; AVANTAGGIATO et al., 2007).

No passado, os testes *in vitro* eram realizados com o intuito de avaliar a eficácia de um AAM frente à uma micotoxina específica. No entanto, dados descritos em Vila-Donat et al. (2018) e resultados de mais de 300 experimentos *in vivo* realizados pelo LAMIC e o Instituto SAMITEC demonstram não haver correlação significativa entre testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* tornaram-se necessários para estabelecer um controle de qualidade, o qual garantirá que o produto não tenha alterações significativas no processo de produção de diferentes lotes e nos testes de triagem e pesquisa de novos produtos potenciais (MALLMANN et al., 2006).

A EFSA reforça esses dados, afirmando que os estudos *in vitro* são uma ferramenta de pesquisa sobre o potencial das substâncias em agirem no controle das micotoxinas e podem fornecer indicações sobre o modo de ação do AAM. No entanto, estudos *in vitro* não representam suficientemente as condições do TGI, as diferenças entre os animais-alvo e seu metabolismo e, conseqüentemente, não podem ser empregados para demonstrar a eficácia de um AAM em condições naturais (EFSA, 2010).

Considerando-se os pontos descritos acima, os testes *in vitro* de eficácia de AAM representam um passo fundamental no desenvolvimento e controle de qualidade dos aditivos; porém, sua real eficácia precisa ser confirmada com estudos *in vivo*, utilizando a espécie desejada.

2.7.2 Testes *in vivo*

Essa é a metodologia tradicional de avaliação de um AAM, sendo particular para cada espécie animal e para cada micotoxina. Os testes *in vivo* necessitam ser conduzidos em unidades experimentais com isolamento térmico, controle de temperatura, controle de qualidade do ar e fluxo controlado de pessoas. Os animais são distribuídos basicamente em quatro tratamentos (Tabela 1). A utilização de no mínimo quatro grupos permite comparar tanto o efeito detoxificante e inocuidade do AAM quanto o efeito negativo da micotoxina. As doses de cada micotoxina utilizada nas dietas experimentais foram previamente estabelecidas seguindo trabalhos publicados na literatura, recomendações do Grupo de Trabalho do MAPA e experimentos realizados pelo LAMIC e SAMITEC. As doses recomendadas para aves foram de no máximo 3, 2, 4, 15 e 200 mg/kg de ração para AFLA, ZEA, OTA, DON e FUM, respectivamente (BRASIL, 2006). A dose do AAM deve ser estabelecida pela empresa requisitante detentora do aditivo, a qual pode ainda requisitar a adição de mais tratamentos com diferentes doses do produto, permitindo a formação de uma curva que informa a possibilidade de variação na porcentagem de inclusão.

Tabela 1 – Distribuição dos tratamentos e inclusão de micotoxinas e aditivos antimicotoxinas (AAMs) na dieta experimental dos animais.

Tratamento	Micotoxina (mg/kg) ¹	AAMs (%) ²
1	Não	0,00
2	Não	100,00
3	Sim	0,00
4	Sim	100,00
5 (Opcional)	Sim	75,00
6 (Opcional)	Sim	50,00

¹As recomendações de doses utilizadas são diferentes para cada micotoxina e foram padronizadas pelo Grupo de Trabalho instituído pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006).

²Percentual da dose máxima dos AAMs recomendada pelo fabricante.








Fonte: (O Autor, 2021).

Embora não haja consenso sobre o delineamento dos testes *in vivo* para avaliação da eficácia dos AAMs, a EFSA publicou uma série de critérios para a

comprovação da eficácia dos mesmos. Dentre esses requisitos estão: mínimo de três estudos *in vivo* que demonstrem eficácia, realizados em pelo menos dois locais diferentes; qualquer extrapolação dos dados obtidos com uma espécie animal para outras espécies é limitada; no caso dos aditivos destinados para todas as espécies animais, os estudos devem ser realizados em pelo menos três espécies principais, uma ave, um mamífero monogástrico e um ruminante; e a inclusão das doses das toxinas deve seguir os parâmetros fixados pela Diretiva 2002/32/EC para a AFB₁ e pela Recomendação 2006/576/EC para DON, ZEA, OTA e FUM (EFSA, 2012).

Conforme demonstrado na Figura 4, de 2005 a 2020, o LAMIC e o Instituto SAMITEC avaliaram *in vivo* um total de 378 AAMs para aves, suínos, bovinos e peixes; apenas 41,3% receberam aprovação, uma vez que foram eficazes em mitigar o efeito das micotoxinas sobre o desempenho dos animais (INSTITUTO SAMITEC, 2020).

Figura 2 – Resultados das avaliações *in vivo* de aditivos antimicotoxinas realizadas no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) e no Instituto SAMITEC entre 2005 e 2020.

Aditivos Antimicotoxinas (AAM) avaliados (2005-2020)					
MICOTOXINAS	PRODUTOS AVALIADOS	PRODUTOS APROVADOS	IN VIVO DENTRO DO PRAZO*	IN VIVO + IN VITRO DENTRO DO PRAZO*	
	Aflatoxinas	102	51	1	0
	Fumonisinias	63	27	5	0
	Toxina T-2	8	2	2	0
	Aflatoxinas + Fumonisinias + Toxina T-2	40	22	5	0
	Aflatoxinas	2	2	1	0
	Aflatoxinas + Fumonisinias + Toxina T-2	2	2	1	0
	Aflatoxinas	1	1	0	0
	Aflatoxinas	4	4	0	0
	Aflatoxinas	3	2	0	0
	Fumonisinias	2	1	0	0
	Aflatoxinas	17	9	1	0
	Fumonisinias	26	11	1	0
	Zearalenona	85	17	1	0
	Toxina T-2	1	0	0	0
	Deoxynivalenol	4	1	1	0
	Aflatoxinas + Fumonisinias + Toxina T-2	12	0	0	0
	Aflatoxina M1	5	3	1	0
	Zearalenona	1	1	1	0
	Total	378	156 (41,3%)	21	0

*De acordo com a Portaria nº 130 de 24 de maio de 2006 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Fonte: (Instituto SAMITEC, 2020).

Parâmetros zootécnicos, morfológicos e bioquímicos, além de biomarcadores, são considerados na avaliação dos resultados. Os parâmetros zootécnicos compreendem especialmente ganho de peso, conversão alimentar e consumo de ração. Os morfológicos incluem lesões, alterações de peso relativo e coloração dos órgãos. E os bioquímicos abrangem, dentre outros, a análise da bioquímica sanguínea, com os parâmetros que são afetados por cada micotoxina e em cada espécie (MALLMANN et al, 2006).

Com relação aos biomarcadores, em geral, a excreção de micotoxinas ou seus metabolitos nas fezes ou urina e a concentração no sangue, plasma, soro, tecidos ou produtos (leite ou ovos) podem ser utilizados para demonstração da eficácia de um AAM na redução da contaminação por micotoxinas (Tabela 2). Os biomarcadores devem ser selecionados de acordo com as micotoxinas e as espécies-alvo; para cada marcador, a relevância (estreita correlação com a exposição) e a disponibilidade de métodos analíticos validados devem ser considerados (EFSA, 2012).

Tabela 2 – Biomarcadores mais relevantes para avaliar a eficácia de um aditivo antimicotoxinas em reduzir a contaminação das micotoxinas no alimento.

Micotoxinas avaliadas	Biomarcadores mais relevantes
AFB ₁	Aflatoxina M ₁ no leite e gema de ovo
DON	DON e seus metabolitos no soro sanguíneo
ZEA	ZEA, α -Zearalenol e β -Zearalenol no plasma Excreção de ZEA e seus metabolitos
OTA	OTA no rim ou soro sanguíneo
FUM B ₁ e B ₂	Relação esfinganina/esfingosina no sangue, plasma ou tecidos

AFB₁ – Aflatoxina B₁, DON – Deoxinivalenol, ZEA – Zearalenona, OTA – Ocratoxina A, FUM B₁ – Fumonisina B₁, FUM B₂ – Fumonisina B₂.

Fonte: (Adaptado de EFSA, 2012).

2.7.3 Testes *ex vivo*

A expressão *ex vivo* (latim: "fora da vida") significa o que ocorre fora de um organismo. Na ciência, *ex vivo* refere-se à experimentação feita em um tecido de um organismo animal em um ambiente externo, com alteração mínima das condições naturais. A utilização desse modelo experimental torna possível reduzir o número de

animais utilizados nos estudos, visto que uma quantidade significativa de explantes pode ser obtida a partir de um único espécime (LALLES; OSWALD, 2015). Dessa forma, a técnica apresenta vantagens tanto do ponto de vista ético quanto financeiro, já que os custos para execução de experimentos envolvendo grande número de animais, como é o caso da avicultura, são altos para as instituições de pesquisa e empresas.

Sendo esse modelo útil para pesquisa de novas drogas e aspectos de eficácia e citotoxicidade de compostos, grupos de pesquisadores vêm utilizando-o em estudos toxicológicos, por vezes associado a câmaras de Ussing, para investigar o efeito das micotoxinas em diversos órgãos de aves e suínos, principalmente no intestino. Através das técnicas *ex vivo*, demonstra-se o impacto das micotoxinas sobre a permeabilidade intestinal, sobre a expressão de proteínas de oclusão intestinais e danos diretos às vilosidades (AWAD et al., 2007; GARCIA et al., 2018; GEREZ et al., 2018; SILVA et al., 2019).

O modelo *ex vivo* utilizando câmaras de Ussing foi empregado pela primeira vez para avaliar o poder sequestrante de dois AAMs, sendo um HSCAS e um extrato de YCW. Um método alternativo para a compreensão do efeito desses AAMs sobre a biodisponibilidade de ZEA foi proposto em intestino de ratos. Os resultados mostraram que, comparado ao HSCAS, o YCW foi mais eficiente em sequestrar ZEA e reduziu o acúmulo de ZEA no tecido intestinal em 40% ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo controle (YIANNIKOURIS et al., 2013). Porém, não há outro relato na literatura utilizando uma câmara de Ussing com o objetivo de testar a eficácia de um AAM.

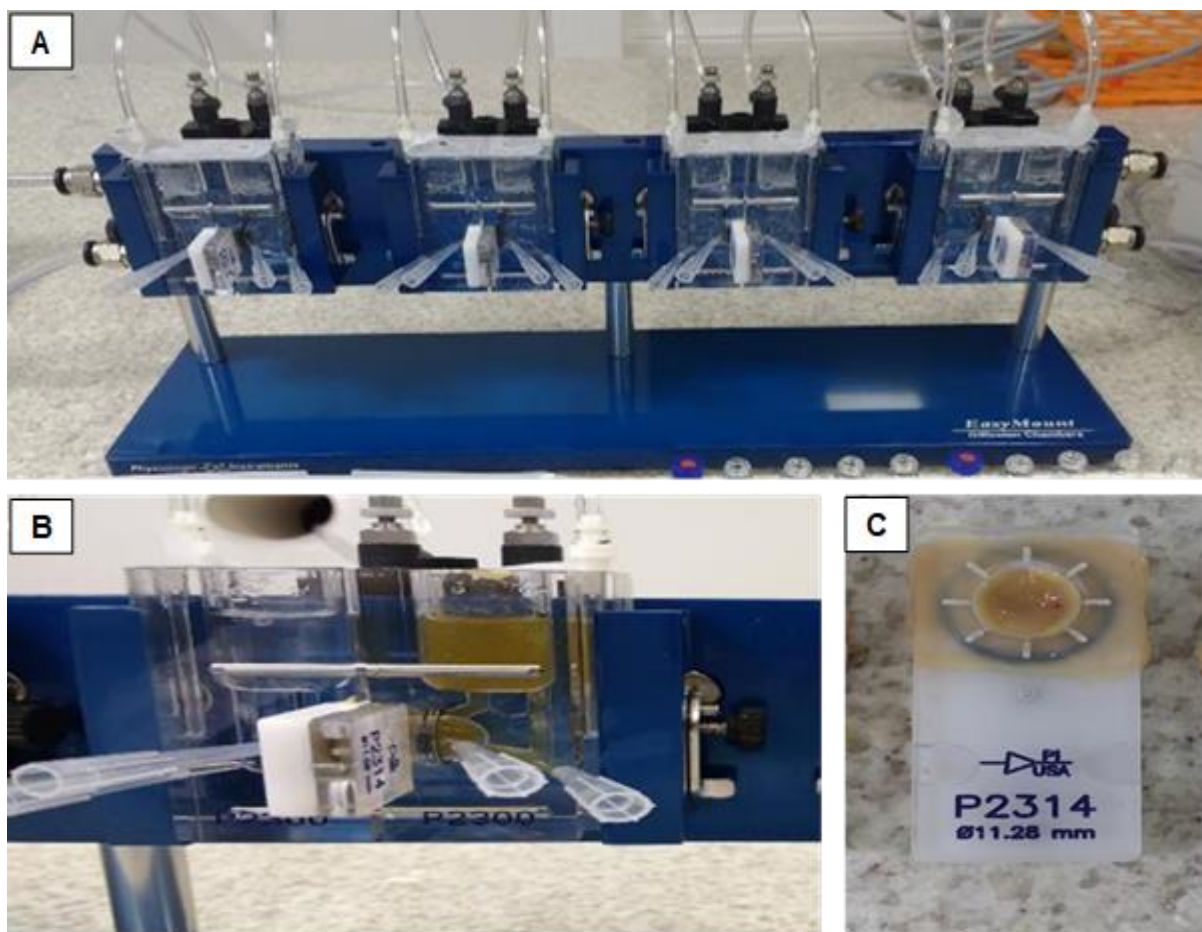
Já a técnica de explantes tem sido aperfeiçoada e frequentemente aplicada nos últimos anos. Garcia et al. (2018) avaliaram a capacidade do *L. rhamnosus* RC007 de mitigar a toxicidade intestinal de DON utilizando explantes jejunais de leitões com 5 semanas de idade; o probiótico degradou rapidamente a toxina e reduziu os efeitos negativos de DON sobre o epitélio intestinal, sobre a resposta pró-inflamatória e sobre a permeabilidade paracelular. Assim, esse método *ex vivo* permitiu comprovar que *L. rhamnosus* RC007 pode se tornar um AAM promissor, capaz de diminuir a toxicidade intestinal de DON.

Baseado na mesma metodologia, Gerez et al. (2018) avaliaram os efeitos tóxicos de DON sobre explantes intestinais suínos e a capacidade de baixas doses de um quito-oligossacarídeo (QOS) de minimizar seus efeitos. O QOS é obtido pela despolimerização da quitosana, um polissacarídeo extraído de cascas de crustáceos

ou de paredes celulares de fungos. Através dessa técnica *ex vivo*, os autores identificaram que o composto não era capaz de impedir os danos causados por DON no intestino, corroborando dados obtidos em um modelo gastrointestinal *in vitro* para aves, que identificou que a quitosana apresentava baixa capacidade de adsorção de DON (SOLÍS-CRUZ et al., 2017).

Apesar desses estudos, ainda não há relatos científicos utilizando explantes intestinais de aves, montados ou não em câmaras de Ussing, demonstrando a eficácia de um AAM ou submetendo a testes com outras micotoxinas, doses e/ou outros AAMs (Figura 5). Entretanto, essa técnica é considerada promissora e mais estudos com essa finalidade devem ser futuramente publicados.

Figura 3 – Câmaras de Ussing empregadas para o desenvolvimento dos testes *ex vivo* utilizando explantes intestinais.



(A) Visão geral do equipamento, composto por quatro câmaras de Ussing, com um bloco aquecido e circulação de O_2 e CO_2 . (B) Visão aproximada de uma das câmaras de Ussing, demonstrando as duas meias câmaras contendo a solução tampão e compostos de interesse, separadas por uma peça onde o tecido é fixado. (C) Imagem da peça, denominada *slider*, onde o tecido é fixado através de pinos de aço. O *slider* é posicionado entre as duas metades da câmara, formando uma barreira.

Fonte: (O Autor, 2021).

2.7.4 Colorimetria

A colorimetria é amplamente utilizada em diversos setores industriais para monitorar a variação de cor dos produtos. Essa metodologia pode ser implementada como um teste adicional para manter o controle de qualidade do produto, baseando-se na análise da coloração do composto. Com o auxílio de um colorímetro, essa avaliação possibilita que a empresa produtora e os clientes do AAM identifiquem mudanças na coloração padrão do produto e uma possível alteração na sua constituição. Sendo assim, a avaliação colorimétrica torna-se importante para determinar a qualidade dos lotes produzidos e fornecer informações complementares aos demais testes de eficácia do AAM (MALLMANN et al., 2011).

CAPÍTULO 3 – USE OF AN *EX VIVO* TEST TO EVALUATE ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES IN POULTRY

Artigo submetido ao periódico *Alternatives to Laboratory Animals*

USE OF AN *EX VIVO* TEST TO EVALUATE ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES IN POULTRY

Vinicius Duarte^a, Adriano Olnei Mallmann^a, Camila Tonini^a, Diogo Liberalesso^b,
Cristiane Rosa da Silva^a, Cristina Tonial Simões^a, Luciane Tourem Gressler^c, Ana
Paula F.R.L. Bracarense^d and Carlos Augusto Mallmann^a

^aFederal University of Santa Maria (UFSM), Laboratory of Mycotoxicological Analyses (LAMIC), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS), Brazil; ^bInstitute of Analytical, Microbiological and Technological Solutions (SAMITEC), SM, RS, Brazil; ^cIndependent Veterinary Researcher, SM, RS, Brazil; ^d State University of Londrina, Laboratory of Animal Pathology, Londrina, Paraná, Brazil.

Use of an *ex vivo* test to evaluate antimycotoxins additives in poultry

Abstract

In vitro tests have been largely performed to evaluate the efficacy of antimycotoxins additives (AMAs). The AMAs are usually included in animal feeds to prevent negative effects of mycotoxicological contaminations. The correlation between *in vitro* and *in vivo* trials is lower, even though both tests are required to determine the AMAs' efficacy. This study was conducted to evaluate an alternative method to evaluate intestinal absorption of aflatoxin B₁ (AFB₁) and AMAs using an *ex vivo* technique. Jejunal explants were obtained from 60 broilers destined to human consumption (n=4/bird, total=240). The explants were subjected to two treatments per trial (n=20 explants/treatment) in Ussing chambers: T1 (control) - 2.8 mg/L of AFB₁, and T2 - 2.8 mg/L of AFB₁ + 0.5% AMA, totalizing 6 assays. Six AMAs of three different types had their ability to reduce intestinal absorption of AFB₁ evaluated: 1) AMA1 and AMA2: hydrated sodium calcium aluminosilicates (HSCAS); 2) AMA3, AMA4 and AMA5: HSCAS + yeast cell wall (YCW) association; and 3) AMA6: HSCAS + YCW and seaweed extracts association. Additionally, each AMA was tested *in vitro* to assess adsorption of AFB₁ in artificial intestinal fluid. In the *ex vivo* tests, AMA1 to AMA6 decreased intestinal absorption of AFB₁ by 67.11%, 73.82%, 80.70%, 85.86%, 86.28% and 82.32%, respectively. As for the *in vitro* results, AMA1 to AMA6 presented an adsorption of 99.72%, 99.37%, 99.67%, 99.53%, 99.04% and 99.15%, respectively. The evaluated *ex vivo* model proved valuable in the assessment of AMAs. No correlation was found between *ex vivo* and *in vitro* findings. Further studies are needed to elucidate the correlation between *ex vivo* and *in vivo* results seeking to reduce animal testing.

Keywords

animal replacement, alternative model, *ex vivo* technique, intestinal explant, broiler, Ussing chamber, aflatoxin B₁, mycotoxin binder

Introduction

Antimycotoxins additives (AMAs) are among the multiple approaches used to detoxify aflatoxin-contaminated feedstuffs.¹ AMAs may bind, inactivate, neutralize or biotransform mycotoxins, thus reducing their negative impact on livestock.² Not all commercially available AMAs have proven efficacy, which should be based on *in vitro* and *in vivo* findings.³⁻⁵

Most *in vitro* studies employ artificial biological fluids or other models mimicking the animal's gastrointestinal tract (GIT).^{6,7} Nonetheless, no significant correlation has been found between *in vitro* and *in vivo* assessments,⁴ and *in vitro/in vivo* extrapolation is a complex issue.⁸ Thus, *in vivo* analysis is essential to prove the efficacy of an AMA; however, the use of animals in research has caused great concern regarding welfare and ethical aspects. Many efforts have been made to develop alternatives to animal testing, but not enough progress has been achieved in eliminating this practice. So far, the number of specimens used has been reduced by associating different techniques.⁹⁻¹¹

Ex vivo testing refers to experiments done in animal tissues subjected to external environment, with minimal changes in the natural conditions.^{12,13} This technique allows to obtain multiple explants from a single specimen.^{14,15} It has been associated with Ussing chambers (UC)¹⁶ to investigate the effect of mycotoxins, since UC is a valuable tool to measure gut integrity.¹⁷ The impact of mycotoxins on intestinal permeability,¹⁸ intestinal occludin expression and direct damage to intestinal villi, as well as products capable of limiting mycotoxins effects,¹⁹⁻²¹ has been demonstrated through this method. Yiannikouris et al.²² conducted the first *ex vivo* trial applying UC to evaluate two AMAs, a hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) and a yeast cell wall (YCW), in live intestinal tissue of rats; the latter was more efficient in binding zearalenone (ZEN). Nevertheless, there are no reports in the relevant literature describing the use of this apparatus to evaluate AMAs efficacy using intestinal fragments of birds.

In light of the above, this study tested an *ex vivo* poultry model associated with UC to assess AMAs efficacy, and compare this results with the *in vitro* evaluations.

Material and Methods

Broilers and feed

Feeds free of aflatoxins, fumonisins, ZEN, deoxynivalenol (DON) and T-2 toxin contamination (verified via high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS) were formulated following nutritional recommendations²³ and offered to 60 broilers destined for human consumption during the starter and grower phases. A feeding design was followed so that twelve birds were sampled daily on the 24th day of live because of the number of UC available to conduct the trials. After cervical dislocation, intestinal samples were collected and immediately tested. As no animal experiment was performed, the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (Brazil) exempted the work from an approval.

Mycotoxin and antimycotoxins additives

A standard aflatoxin B₁ (AFB₁) was purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), diluted and used at 1.0 and 2.8 mg/L in *in vitro* and *ex vivo* trials, respectively. Three types of AMAs were evaluated, totalling six commercially available products (names have been omitted to ensure confidentiality): 1) AMA1 and AMA2: HSCAS; 2) AMA3, AMA4 and AMA5: HSCAS+YCW association; and 3) AMA6: HSCAS+YCW and seaweed extracts association. The toxin and the AMAs were directly included in the solution in the UC.

In vitro methodology

An *in vitro* assay was conducted with each AMA before *ex vivo* testing. The product was incubated with AFB₁ at 1.0 mg/L (concentration normally used to assess AMAs *in vitro*) in an artificial intestinal solution at pH 6.0.²⁴ Based on recommendation of AMAs' suppliers, an inclusion rate of 0.5% was used (three replicates/AMA); calculation was made according to the volume of the solution in the chamber. The *in vitro* adsorption calculation was estimated from the difference between the fluid with the presence of AMA and the fluid without it using a QTrap 5500 HPLC-MS/MS System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) equipped with a Turbo Ion Spray electrospray ionisation (ESI) source and a 1290 Series HPLC System (Agilent, Waldbronn, Baden-Württemberg, Germany).

Ex vivo methodology

Four intestinal explants with 2 cm were collected from each broiler, totalling 240 samples (40 samples/AMA). The intestine was opened along the mesenteric border to remove the digesta and washed with cold salty isotonic solution. A pilot study evaluated fragments of duodenum, jejunum and ileum to identify the portion with the best viability (assessed via histopathology after 120-min exposure in the UC). Passage of the toxin across the intestinal explant was also analysed. Additionally, serosal and seromuscular layers were removed with micro tweezers and scalpels. Results indicated the jejunum with all its layers as the most suitable portion to perform the experiment.

Four pairs of UC (Easy Mount Ussing Chambers, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA) were used. Each chamber half was connected to one vessel containing the same volume of the buffer solution with equal mineral composition. Both vessels were bubbled with a blend of 95% O₂ and 5% CO₂, which maintained tissue oxygenation and also worked as a supporting gas for the recirculation of the solution in each chamber. The vessels were kept at 37°C through warm water circulation in the coating around.

The intestinal segment was fixed on the slider between the apical and basolateral sides of the UC. Total area of intestinal contact with the mycotoxin-enriched solution, which corresponds to the free area where the explant is fixed, was 1.0 cm² (Figure 1).

Figure 1. Ussing chambers used in the *ex vivo* tests with jejunal explants of broilers.



(A) General view of the equipment, which includes four Ussing chambers, with a heater block and O₂ and CO₂ circulation. (B) Close view of an Ussing chamber, showing the two chamber halves with the buffer solution and the substance under evaluation, separated by a piece where the tissue is fixed. (C) The slider, where the tissue is fixed by the steel pins. The slider is positioned between the two middle chambers, forming a barrier.

The explants were subjected to two treatments per AMA (two replicates/treatment) in a block design: T1 (control) - 2.8 mg/L of AFB₁; and T2 - 2.8 mg/L of AFB₁ + 0.5% AMA. *In vivo* testing with AMAs routinely use AFB₁ at 2.8 mg/kg, hence the choice to replicate it in the *ex vivo* trials. The jejunal explant was subjected to the UC process for 120 min; a previously

incubated solution with AFB₁ and the AMA was included in two UC; in the other two chambers, only AFB₁ was added. The AMAs were incubated with AFB₁ for 30 min prior to testing. The amount of AFB₁ absorbed by the intestinal fragment was measured by HPLC-MS/MS; thus, it was possible to verify the intestinal capacity to absorb the mycotoxin either in the presence of an AMA or not. The following buffer solution (in mmol/L) was used for all the washings and incubations: NaCl - 128, KCl - 4.7, CaCl₂ - 2.5, KH₂PO₄ - 1.2, MgSO₄ - 2.6, NaHCO₃ - 2.0 and D-glucose - 5.0; pH was maintained at 6.8.

Mycotoxin extraction

Immediately after the UC procedure, the explant was placed in a 15 ml Falcon tube with 4 ml of a AFB₁ extraction solution (acetonitrile:water 84:16 v/v) for 1 h. Subsequently, it was macerated to increase contact surface with the solution to ensure complete extraction of the mycotoxin. The macerated tissue remained in contact with the solution for 1 h, then it was removed and discarded. The tube was centrifuged (10 min, 2,058 x g), then the supernatant was collected and transferred to a 2 ml Eppendorf tube which was also spun (10 min, 20,854 x g, 4 °C). The supernatant was transferred to another 2 ml Eppendorf tube and this content constituted the sample which was diluted and injected into the HPLC-MS/MS system to determine the concentration of the mycotoxin.

Performance parameters in HPLC-MS/MS analysis

Selectivity was obtained through the addition of potentially interfering factors, both in blank and enriched samples. Linearity was obtained by developing a calibration curve consisting of seven concentration levels: 1, 2, 5, 10, 25, 50 and 100 µg/L; each level had a specific solution prepared in triplicate. Instrumental readings were randomly performed. Linearity was observed by the graphic of the assays results, depending on the concentration of the analyte, and was

verified based on the linear regression equation, which was determined by the least squares method.

The matrix effect was evaluated by establishing two calibration curves with seven levels each, as follows: a) calibration curve of the analyte in solution: formulated from pure analyte calibration standards in the solvent; and b) calibration curve of the blank matrix extract fortified with pure analyte calibration standards.

Statistical analysis

The number of blocks was set according to the test power criterion, with the aid of the software Gpower 3.1.5°, using the means and standard deviations obtained in the pilot experiment. A test power of 0.99 was considered for the experimental design calculations. Statistical analyses were conducted using the software Statgraphics Centurion XV (Manugistics Inc., Rockville, USA). Data were subjected to ANOVA using the F Test at 5%. Pearson's correlation was performed between the results obtained in the *ex vivo* and *in vitro* tests. Mean differences in the percentage of reduction in AFB₁ absorption among the AMAs were separated using Tukey's HSD test.

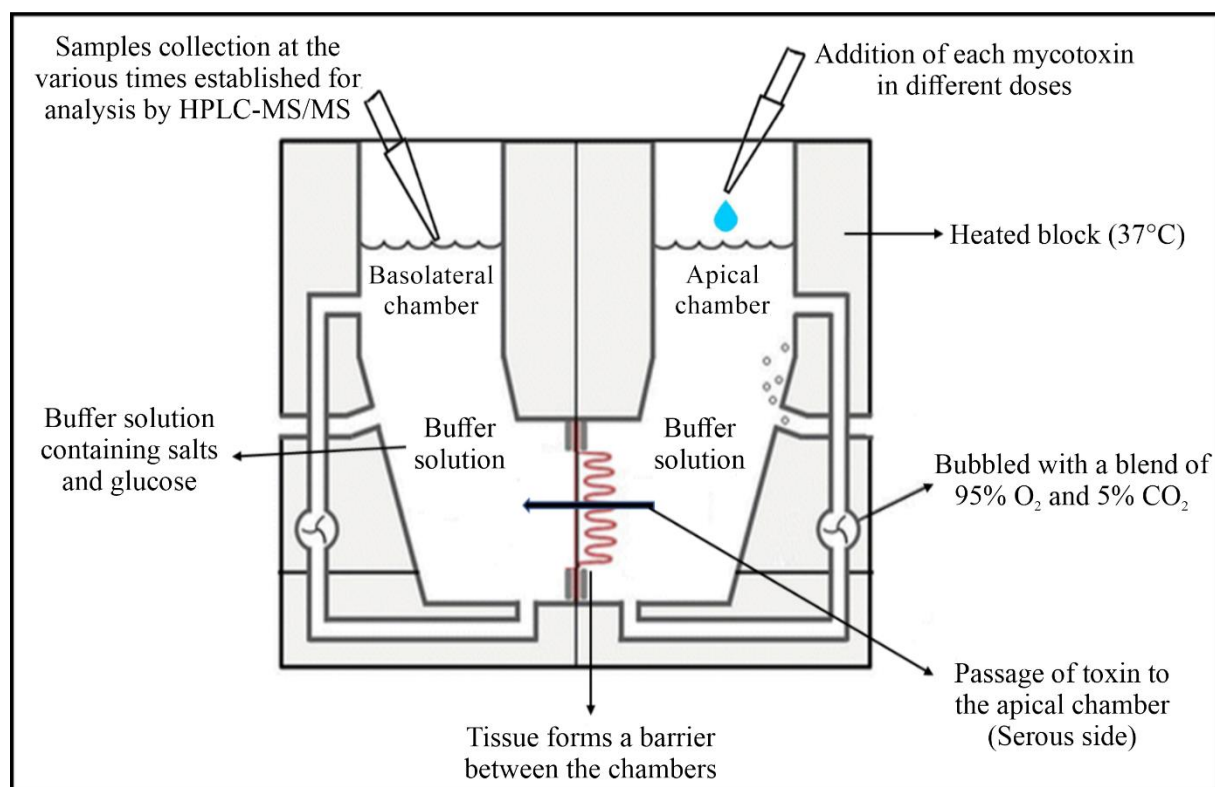
Results

In vitro and ex vivo analyses

This study originally aimed to measure AFB₁ passage from the mucosal to the serosal side of the intestine, that is, from the apical to the basolateral side of the chamber, thus verifying the passage across the intestinal explant in the presence or absence of an AMA (Figure 2). Initial testing subjected an entire intestinal segment to the equipment; however, no significant AFB₁ passage was observed. Afterwards, the seromuscular layer was removed and the explant was resubjected to AFB₁; stripping was expected to allow the toxin to pass to the basolateral side,

since it isolates the tissue from the outside, but passage through the serosal layer was not significant (0.1 to 0.5%).

Figure 2. Schematic drawing of a pair of Ussing chambers.

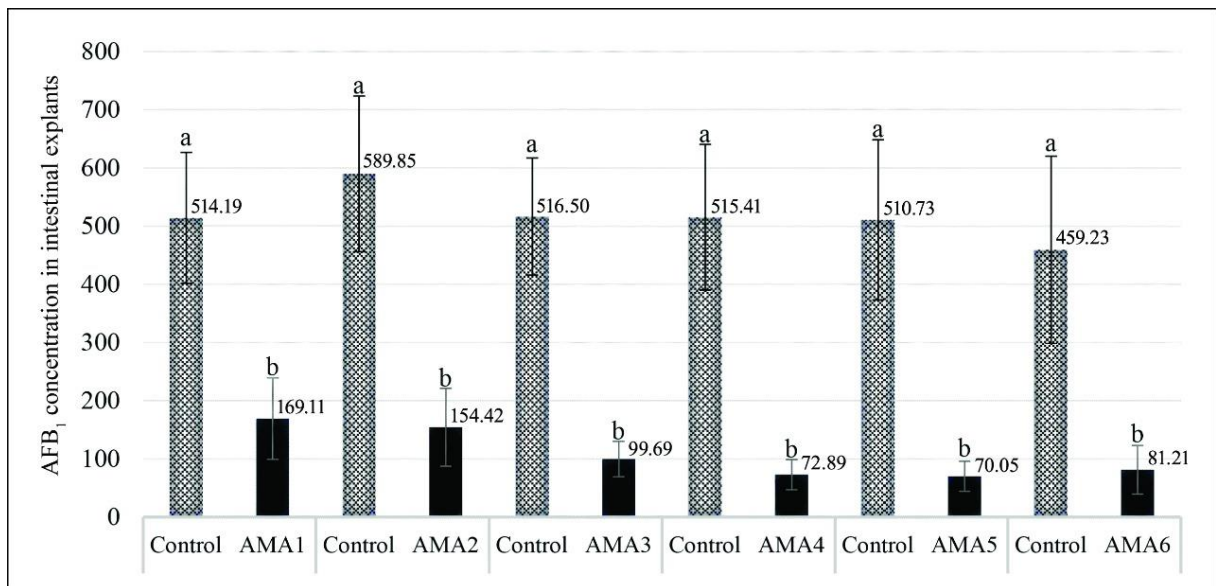


The next step was to evaluate the concentration of AFB₁ retained in the intestinal explant. Exposure to AFB₁ in the presence or not of an AMA was then performed after having consolidated the technique in the UC with verification of intestinal absorption at different times (Figure 3).

The AMAs were able to bind AFB₁ and prevent its absorption by the intestinal epithelium. There was a lower concentration of the toxin in the intestinal explant in the presence of all AMAs in comparison to the explant exposed to AFB₁ alone ($p < 0.0001$). AMA1 to AMA6 reduced the intestinal absorption of AFB₁ by 67.11%, 73.82%, 80.70%, 85.86%, 86.28% and 82.32%, respectively ($p < 0.0001$); there was a difference between additives in the ability to

reduce intestinal absorption of AFB₁ ($p < 0.0001$). *In vitro* data demonstrated an absorption ability of 99.72%, 99.37%, 99.67%, 99.53%, 99.04% and 99.15%, for AMA1 to AMA6, respectively; no significant difference was seen between the AMAs ($p > 0.05$). No correlation (Pearson's correlation, $p > 0.05$) was found between *ex vivo* and *in vitro* findings; so, even though the AMAs presented an adsorption above 99% in the *in vitro* trials, a different pattern was observed in the *ex vivo* assays (Table 1).

Figure 3. Aflatoxin B₁ concentration in jejunal explants of broilers in the presence or absence of antimycotoxins additives.



AFB₁: aflatoxin B₁ (µg/kg); AMA1-6: antimycotoxins additives 1 to 6; a-b: means with different letters in the same trial indicate significant difference (F test; $p < 0.0001$).

Performance of HPLC-MS/MS analysis

The sample matrix may contain elements which interfere in the measuring performance and may increase/decrease the result. In this study, selectivity was verified by comparing the signs coming from the reading of the processed sample and the analyte of interest. There was no statistically significant difference regarding the impact of the matrix on AFB₁ recovery ($p > 0.05$). The r value for AFB₁ was 0.9971 (Table 2).

Table 1. Results of *ex vivo* and *in vitro* tests evaluating six antimycotoxins additives against aflatoxin B₁ in broilers.

AMAs	[AFB ₁] in intestinal explants ¹			<i>Ex vivo</i> ²	<i>In vitro</i> ³
	Control (n = 20)	AMAs (n = 20)	SEM		
1	514.19 ^a	169.11 ^b	43.86	67.11% ^C	99.72%
2	589.85 ^a	154.42 ^b	53.97	73.82% ^{BC}	99.37%
3	516.50 ^a	99.69 ^b	48.97	80.70% ^{AB}	99.67%
4	515.41 ^a	72.89 ^b	51.94	85.86% ^A	99.53%
5	510.73 ^a	70.05 ^b	53.19	86.28% ^A	99.04%
6	459.23 ^a	81.21 ^b	49.50	82.32% ^A	99.15%
SEM			1.130	0.084	

AMAs1-6: antimycotoxins additives 1 to 6; SEM: standard error of the mean; ¹[AFB₁]: aflatoxin B₁ concentration (in µg/kg); ²reduction in AFB₁ absorption by the intestine in the presence of the AMAs; ³adsorption of AFB₁ by the AMAs in intestinal fluid (pH 6). ^{a,b} means with different letters between columns differ significantly (F test; $p < 0.0001$). ^{A,B,C} means with different letters between lines differ significantly (Tukey's test; $p < 0.0001$).

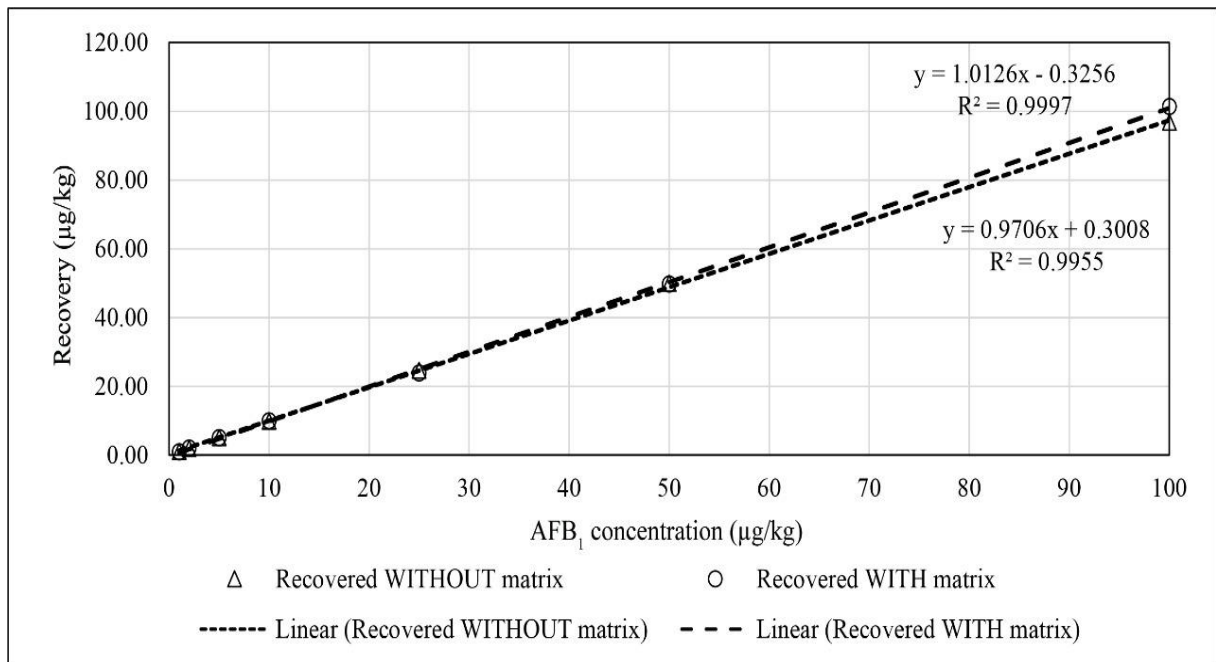
Table 2. Matrix effect on aflatoxin B₁ (AFB₁) recovery from intestinal samples of broilers.

Level	Expected (µg/L)	Recovered WITHOUT matrix (µg/L)					
		Triplicate 1	Triplicate 2	Triplicate 3	Mean	SD	% Precision
1	1	1.07	1.12	1.17	1.12	0.05	112.00
2	2	2.12	1.95	1.71	1.93	0.20	96.33
3	5	5.53	4.72	5.02	5.09	0.41	101.77
4	10	10.20	9.31	9.95	9.82	0.46	98.20
5	25	26.90	23.80	23.40	24.70	1.91	98.87
6	50	55.30	47.60	47.10	50.00	4.59	100.13
7	100	102.00	94.70	93.60	96.77	4.56	100.10
Level	Expected (µg/L)	Recovered WITH matrix (µg/L)					
		Triplicate 1	Triplicate 2	Triplicate 3	Mean	SD	% Precision
1	1	0.81	1.18	1.03	1.01	0.18	100.53
2	2	1.96	2.14	1.90	2.00	0.12	100.07
3	5	5.10	5.43	4.71	5.08	0.36	101.70
4	10	10.20	10.30	9.48	9.99	0.44	99.93
5	25	23.90	24.20	23.50	23.87	0.35	95.47
6	50	49.90	50.90	48.50	49.77	1.20	99.63
7	100	102.00	103.00	99.30	101.43	1.91	101.43

SD: standard deviation. There was no significant difference between the use of matrix or not in AFB₁ recovery (Tukey's test; $p > 0.05$).

Linearity evaluation was performed by the visual inspection of the linear regression chart of the calibration curves with and without matrix. A linear correlation coefficient (R^2) over 0.99 was considered as ideal. The regression equation used to determinate the line was $y = ax + b$ (Figure 4).

Figure 4. Linearity of the curves of aflatoxin B₁ (AFB₁) recovery with and without the matrix.



Discussion

These findings are in line with those disclosed by Yiannikouris et al.,²² who used UC mounted with intestinal segments of rats and subjected them to ZEN challenge; the mycotoxin concentration in the tissue was almost the same as that in the chamber, indicating that ZEN concentration gradient was maintained from the basolateral side into the tissue. Nevertheless, passage of ZEN to the serosal side was restricted (0.4%). The authors suggested that such behaviour could be associated with the lipophilic properties of ZEN, which may lead to an interaction with the lipidic membranes of the intestinal epithelium and cause its encapsulation.

Another study also reported no significant toxin passage to the serosal side of jejunum when assessing DON transport across swine intestines.²⁵ Pigs received feed containing DON

(0, 4 or 8 ppm) and were slaughtered to obtain explants to be mounted on UC; DON (4 or 8 ppm) was introduced to the mucosal side, then the flux rate was evaluated in the specimens that had or not received the contaminated feed. There was a low flux rate in mucosal-to-serosal direction, but the DON-fed animals showed greater permeation due to the damage the toxin had caused *in vivo*. The authors raised two possibilities to explain these findings: DON metabolism in the jejunal epithelia or its accumulation in the tissues.

On the other hand, Awad et al.¹⁸ mounted chicken jejunum on UC and evaluated the flux rate of DON from the mucosal to the serosal side at 30, 60, 90 and 120 min. There was 6.3% passage at 120 min, which is higher than that registered herein. A review of the relevant literature did not disclose any results about AFB₁ passage through intestinal explants of birds using UC.

With respect to the removal of the seromuscular layer of the intestine described here, stripping was highly detrimental; the villi and the tissue structure were damaged, so the explant could not be used in the UC. Such data are in agreement with those reported when evaluating the viability of employing the UC to determine jejunal permeability of highly permeable compounds in several species; tissues were histologically analysed before and after using the apparatus.²⁶ Dissection of the jejunal seromuscular layer of turkeys, dogs, pigs and horses indicated the intestines of the two first species as inadequate for permeability evaluations. Moreover, attempts to remove the jejunal tissue of birds failed due to mucosal damage. The authors stated that intense epithelial damage and accumulation of mucus and cellular debris in the lumen are accountable for the low and greatly variable permeability across the jejunum of turkeys and dogs; the intestine of the pigs, in turn, was highly permeable. The findings observed in birds were attributed to the longer villi, the existence of wider and more numerous tight junctions facilitating paracellular transport, and the greater concentration and secretion rate of bile salt in this species.

Despite being scarce, literature reports indicate a low rate of mycotoxins passage through intestinal explants of birds²⁵ as well as a low tissue viability after stripping,²⁶ thus leading to unreliable outcomes. In view of that, the present investigation measured the amount of mycotoxin absorbed by the entire structure of the intestinal epithelium with all its layers intact.

As to efficacy tests, AMAs had a high percentage of adsorption *in vitro* and prevented absorption of the toxin. Nonetheless, the fact that they did not demonstrate the same percentage of adsorption when tested *ex vivo* must be highlighted, indicating that AFB₁ presented a greater affinity for the epithelium than for the AMAs. All AMAs showed an *in vitro* adsorption over 99%, while reduction in intestinal absorption of AFB₁ ranged from 67.11% to 86.28%; this may explain the differences commonly observed between *in vitro* and *in vivo* results: products which have an excellent *in vitro* efficacy show little or no efficacy *in vivo*. So, when included in animal feed, the AMA does not have the same potential to reduce the concentration of the toxin as it does *in vitro*, demonstrating that interaction of the toxin with the epithelium is more complex than the *in vitro* simulation of the intestinal juice.

The European Food Safety Authority reinforces these data: *in vitro* assays are considered a viable tool to analyse the potential of AMAs to act in mycotoxin control and may be used to provide information about their mechanism of action. Nevertheless, it mentions that such tests do not fully represent the conditions of the GIT and the differences between the target-animals and their metabolism and, consequently, must not be employed to demonstrate the efficacy of an AMA under natural conditions.²⁷

An *in vitro* model simulating the swine GIT was firstly used to evaluate the potential of activated carbon and cholestyramine to adsorb ZEN.⁶ The method consists of four successive compartments simulating the stomach, duodenum, jejunum and ileum. The potential of several

AMAs to adsorb or inactivate mycotoxins was demonstrated by using simulations of the gastric, biliary and pancreatic secretions as well as bicarbonate to control the compartmental pH.^{6,7,28}

The explants technique has recently been improved. Zhang et al.²⁹ mounted ileal fragments of broilers which had been damaged by *Clostridium perfringens* *in vivo* on UC and found a protective effect of dietary L-arginine upon the intestinal barrier. Another assessment used jejunal explants of piglets and showed *Lactobacillus rhamnosus* RC007 to be a promising AMA due to its ability to reduce DON toxicity.¹⁹ The same methodology was applied to evaluate DON's effect on intestinal explants of swine, and the ability of low doses of a chito-oligosaccharide to lessen the toxin's effects;²⁰ the product was not able to avoid DON-induced damage.

Different results have been achieved in *in vitro* and *ex vivo* models applied to evaluate the adsorbent effect of a blend of probiotics (*Lactobacillus* and *Propionibacterium*) on AFB₁ in broilers.³⁰ The adsorption potential obtained *in vitro* ranged from 57% to 66%, while in the *ex vivo* assay it was 25%; nonetheless, the *ex vivo* technique referred to animals' anaesthesia, ligation of a jejunal segment and injection of the toxin and probiotics. Another work evaluated the effects of DON upon intestinal morphology and activation of the mitogen activated protein kinases (MAPK) through *in vivo* and *ex vivo* models;³¹ results indicated the latter approach as a valuable tool to assess gastrointestinal toxicity after exposure to low doses of toxins.

Conclusions

This is the first report on the use of UC to evaluate AMAs' efficacy employing intestinal explants of broilers. This *ex vivo* model proved valuable in the assessment of AMAs, and no correlation was found between *ex vivo* and *in vitro* findings. Further studies are required to establish the correlation between the present technique and *in vivo* studies; a positive correlation is expected so that testing of AMAs' efficacy in animals may be abolished. Moreover, this *ex*

in vivo methodology will allow the development of experiments which are not easily conducted *in vivo*, as multi-contamination of mycotoxins at low doses, which is a reality in the field.

Acknowledgements

Carlos Augusto Mallmann is grateful for the fellowship of research productivity (PQ) granted by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors also thank the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for providing graduate fellowship to Camila Tonini and Cristina Tonia Simões.

Declaration of Conflicting Interests

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This study was funded in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), in the form of a fellowship of research productivity (PQ; grant number 310190/2018-5) awarded to Carlos Augusto Mallmann. No additional external funding was received.

References

1. Oguz H. Detoxification of aflatoxin in poultry feed: a review from experimental trials. *Lohmann Infor* 2012; 47: 45-56.
2. Murugesan GR, Ledoux DR, Naehrer K, et al. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. *Poult Sci* 2015; 94: 1298-1315.

3. Brasil. Portaria no. 130, 24 de maio de 2006. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, Distrito Federal, 25 de mai. 2006, seção 2, p. 5.
4. Mallmann CA, Rauber RH, Dilkin P, et al. Correlação entre o desempenho de aditivos antimicotoxinas (AAM) para aves em testes *in vitro* e *in vivo*. *Rev Bras Cienc Avic* 2007; 9: 176-185.
5. Vila-Donat P, Marín S, Sanchis V, et al. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food Chem Toxicol* 2018; 114: 246-259.
6. Avantiaggiato G, Havenaar R and Visconti A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. *Food Chem Toxicol* 2003; 41: 1283-1290.
7. Avantiaggiato G, Havenaar R and Visconti A. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an *in vitro* gastrointestinal model. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 4810-4819.
8. Cheli F, Fusi E and Baldi A. Cell-based models for mycotoxin screening and toxicity evaluation: an update. *World Mycotoxin J* 2014; 7(2): 153-166.
9. Cheli F, Giromini C and Baldi A. Mycotoxin mechanisms of action and health impact: ‘*in vitro*’ or ‘*in vivo*’ tests, that is the question. *World Mycotoxin J* 2015; 8(5): 573-589.
10. Cheat S, Gerez JR, Cognie J, et al. Nivalenol has a greater impact than deoxynivalenol on pig jejunum mucosa *in vitro* on explants and *in vivo* on intestinal loops. *Toxins* 2015; 7: 1945-1961.
11. Morales MM. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? *Cien Cult* 2008; 60: 33-36.

12. Randall KJ, Turton J and Foster JR. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol Toxicol* 2011; 27: 267-284.
13. Basso KM and Bracarense APFRL. Explantes teciduais: um modelo redescoberto na experimentação animal. *Semina: Ciênc Agrár* 2013; 34: 3951-3958.
14. Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm Sci* 2012; 46: 367-373.
15. Lalles JP and Oswald IP. Intestinal Health. In: Niewold T (ed) *Techniques for investigating gut function in vivo, ex vivo and in vitro in monogastric farm animals*. Netherlands: Wageningen Academic, 2015, pp. 191-209.
16. Ussing HH and Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 1951; 23: 11-27.
17. Thomson A, Smart K, Somerville MS, et al. The Ussing chamber system for measuring intestinal permeability in health and disease. *BMC Gastroenterol* 2019; 19: 98-99.
18. Awad WA, Aschenbach JR, Setyabudi FM, et al. *In vitro* effects of deoxynivalenol on small intestinal D-glucose uptake and absorption of deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens. *Poult Sci* 2007; 86: 15-20.
19. Garcia GR, Payros D, Pinton P, et al. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. *Arch Toxicol* 2018; 92: 983-993.
20. Gerez JR, Buck L, Marutani VH, et al. Low levels of chito-oligosaccharides are not effective in reducing deoxynivalenol toxicity in swine jejunal explants. *Toxins* 2018; 10: 276-287.
21. Silva EO, Gerez JR, Hohmann MSN, et al. Phytic acid decreases oxidative stress and intestinal lesions induced by fumonisin B₁ and deoxynivalenol in intestinal explants of pigs. *Toxins* 2019; 11: 1-14.

22. Yiannikouris A, Kettunen H, Apajalahti J, et al. Comparison of the sequestering properties of yeast cell wall extract and hydrated sodium calcium aluminosilicate in three *in vitro* models accounting for the animal physiological bioavailability of zearalenone. *Food Addit Contam Part A* 2013; 30: 1641-1650.
23. Cobb-Vantress. Broiler Performance & Nutrition Supplement. Cobb-Vantress Inc., Siloam Springs, AR, 2018.
24. Pharmacopeia National Formulary. The United States Pharmacopeia, 1990, pp. 1788-1789.
25. Halawa A, Dänicke S, Kersten S, et al. Intestinal transport of deoxynivalenol across porcine small intestines. *Arch Anim Nutr* 2013; 67: 134-146.
26. Neirinckx E, Vervaet C, Michiels J, et al. Feasibility of the Ussing chamber technique for the determination of *in vitro* jejunal permeability of passively absorbed compounds in different animal species. *J Vet Pharmacol Ther* 2010; 34: 290-297.
27. European Food Safety Authority - EFSA. Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group ‘substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins’. *EFSA Journal* 2010; 8: 1693-1700.
28. Avantaggiato G, Havenaar R and Visconti A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 817-824.
29. Zhang B, Lv Z, Li H, et al. Dietary L-arginine inhibits intestinal *Clostridium perfringens* colonisation and attenuates intestinal mucosal injury in broiler chickens. *Brit J Nutr* 2017; 118: 321-332.
30. Gratz S, Mykkänen H and El-Nezami H. Aflatoxin B₁ binding by a mixture of *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: *in vitro* versus *ex vivo*. *J Food Prot* 2005; 68: 2470-2474.

31. Lucioli J, Pinton P, Callu P, et al. The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: Interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. *Toxicol* 2013; 66: 31-36.

CAPÍTULO 4 – IMPACT OF DEOXYNIVALENOL ON INTESTINAL EXPLANTS OF BROILER CHICKENS: AN *EX VIVO* MODEL TO ASSESS ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES

Artigo submetido ao periódico *Food and Chemical Toxicology*

IMPACT OF DEOXYNIVALENOL ON INTESTINAL EXPLANTS OF BROILER CHICKENS: AN *EX VIVO* MODEL TO ASSESS ANTIMYCOTOXINS ADDITIVES

Vinicius Duarte^a, Adriano Olnei Mallmann^a, Diogo Liberalesso^b, Cristina Tonial Simões^a, Luciane Tourem Gressler^c, Francieli Adriane Molossi^d, Ana Paula F.R.L. Bracarense^e and Carlos Augusto Mallmann^a

^aFederal University of Santa Maria (UFSM), Laboratory of Mycotoxicological Analyses (LAMIC), Santa Maria (SM), Rio Grande do Sul (RS), Brazil; ^bInstitute of Analytical, Microbiological and Technological Solutions (SAMITEC), SM, RS, Brazil; ^cIndependent Veterinary Researcher, SM, RS, Brazil; ^dFederal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Veterinary pathology, Porto Alegre, RS, Brazil; ^eState University of Londrina (UEL), Laboratory of Animal Pathology, Londrina, Paraná, Brazil

Impact of deoxynivalenol on intestinal explants of broiler chickens: an *ex vivo* model to assess antimycotoxins additives

Abstract

The impact of deoxynivalenol (DON) upon intestinal tissue of broilers was assessed by using jejunal explants in Ussing chambers and analyzing histopathological and immunohistochemical parameters; this system was also applied to evaluate the efficacy of an antimycotoxins additive (AMA). The explants were subjected to the following treatments within each experiment for 120 min: Experiment 1) T1 (control) - buffer solution, and T2 - 10 mg/L DON (two replicates/treatment); and Experiment 2) T1 (control) - buffer solution, T2 - 10 mg/L DON, T3 - AMA (0.5%), and T4 - 10 mg/L DON + 0.5% AMA. In Experiment 1, DON triggered a reduction in the size of enterocytes as well as of their nuclei, an increase in cytoplasmic vacuolization and apical denudation of villi. Apoptotic cells count was also greater in DON-exposed explants. In Experiment 2, the AMA mitigated DON harmful effects; cytoplasmic vacuolization of enterocytes was reduced and the size of their nuclei was preserved. The additive also promoted a partial decrease in microvillus integrity, in size of enterocytes and in apoptotic cells count. The tested *ex vivo* model demonstrated the impact of DON upon the intestine as well as the efficacy of the AMA against its damaging effects.

Keywords: histopathology, intestinal integrity, apoptosis, mycotoxin binder, Ussing chamber

Introduction

Risk assessment of mycotoxins exposure was initially oriented towards their negative impact upon poultry productivity as well as mutagenic and carcinogenic effects. Nevertheless, there is growing understanding of the adverse effects of various mycotoxins on the immune system (Oswald et al., 2005) and on intestinal integrity of poultry (Grenier and Applegate, 2013; Lucke et al., 2018).

The intrinsic intestinal barrier is composed of epithelial cells, which line the inner surface of the digestive tract, and tight junctions, which seal adjacent epithelial cells. Mycotoxins, particularly deoxynivalenol (DON), negatively affect the intrinsic component of the intestinal barrier by disrupting epithelial integrity and decreasing replacement and repair of epithelial cells (Pinton and Oswald, 2014). Such effects lead to an imbalance in the animal defense systems, which increases susceptibility to infectious diseases or worsens existing illnesses as necrotic enteritis, induced by *Clostridium perfringens* (Antonissen et al., 2014), and coccidiosis (Grenier et al., 2016) in broiler chickens.

In a meta-analysis including almost 100 published experiments in animals, Grenier and Appelgate (2013) analyzed the impact of exposure to the main mycotoxins upon several intestinal functions. Based on the compiled studies, which include *ex vivo* investigations, the authors describe that mycotoxins, especially DON, can impair intestinal processes as digestion, absorption, permeability, defense and microbiota, all of which result in poor health status and lower productivity.

Several *ex vivo* techniques, including cell culture, explants and organoids, have been used to determine the effects of drugs and contaminants on intestinal functions (Maresca et al., 2018). The explant technique has drawn particular attention because it contains all types of cells and proportions normally present in the epithelium; furthermore, it allows to subject fragments of organs derived from a single donor to different treatments, and to control the environmental

conditions to which the tissue is exposed (Rozehnal et al., 2012). Thus, the *ex vivo* analysis with explants provides a better representation of the complex morphology present in the whole animal, improving reproducibility of the various possible processes seen *in vivo* (Randall et al., 2011).

For being a useful model to investigate compounds toxicity, researchers have employed *ex vivo* methodologies, sometimes in association with Ussing chambers (UC), to evaluate the effect of mycotoxins on the intestinal mucosa of a diversity of species. Awad et al. (2011a) assessed the effect of DON on glucose transport across the intestinal mucosa of broilers; Silva et al. (2019) studied the impact of DON and fumonisin B₁ (FB₁) on intestinal morphology, apoptosis and expression of proteins associated with cell junctions in explants of swine; and Garbetta et al. (2015) analyzed the influence of fumonisins (FBs) on the induction of lipid peroxidation in intestinal explants of rats.

In vitro and *in vivo* analyses are currently required when testing the efficacy of antimycotoxins additives (AMAs) for poultry. Nonetheless, there is a low correlation between such tests; therefore, *in vivo* assays remain essential to determine the real efficacy of an antimycotoxins additive (AMA) due to the diverging results obtained in *in vitro* trials (Cheli et al., 2014; Mallmann et al., 2007). But animal testing has been a matter of great concern with respect to welfare and ethical issues, and the wide controversy usually triggers legal debates between animal rights groups and researchers (Morales, 2008).

Thus, this investigation was aimed at assessing the impact of DON on intestinal tissue of broiler chickens by applying an *ex vivo* technique using jejunal explants mounted on UC. The feasibility of using this method to complement the *in vivo* and *in vitro* assays employed to verify the efficacy of an AMA for poultry was also evaluated.

Material and Methods

Study design

No animal experiment was performed to carry out the present investigation, so it was exempted from an approval by the Ethics Commission on Animal Use of the Federal University of Santa Maria. Twenty-two broilers destined for human consumption were sampled for this assessment. At day 21, they were slaughtered by cervical dislocation and four jejunal explants were immediately obtained from each specimen for the *ex vivo* analyses in UC. From the 88 collected samples, 40 (n=10 birds) were used in Experiment 1, which evaluated the impact of DON on the intestinal tissue, and 48 (n=12 birds) in Experiment 2, which tested the AMA.

The intestinal explants were mounted on UC and subjected to the following treatments within the experiments, each bird being considered as one block: Experiment 1) T1 (control) - buffer solution only, and T2 - 10 mg/L DON (two replicates/treatment); and Experiment 2) T1 (control) - buffer solution only, T2 - 10 mg/L DON, T3 - AMA (0.5%) only, and T4 - 10 mg/L DON + 0.5% AMA.

Feed analysis

Analyses of aflatoxins, FBs, zearalenone, DON and T-2 toxin were performed in the feed offered to the broilers through high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). Results indicated that the feed was free of mycotoxins contamination; moreover, recommendations on nutritional requirements established for the lineage were followed (Cobb-Vantress, 2018).

Mycotoxin and antimycotoxins additive

DON standard was acquired from Romer Labs (Biopure, Romer Labs, Tulln, Austria) and added directly to the mucosal side of the jejunum in the UC at 10 mg/L. The AMA was

commercially obtained and consisted of bentonite, hydrated sodium calcium aluminosilicate, calcareous seaweed and yeast. It was included at 0.5% (according to the suppliers' recommendation) and incubated with DON 30 min before the commencement of the tests in the UC.

Ex vivo methodology

Following extraction, the intestine was immediately opened along the mesenteric border to carefully remove the digesta and then washed with cold salty isotonic solution. The intestinal segment was fixed on the slider (piece containing steel pins where the tissue is fixed between the two sides of the chamber) and positioned in four pairs of UC (Easy Mount Ussing Chambers, Physiologic Instruments, San Diego, CA, USA). The total area of intestinal contact with the solution in the camera was 1.0 cm².

Each chamber was kept at 37 °C and bubbled with carbogen (95% O₂ / 5% CO₂). The following buffer solution (in mmol/L) was used for all washings and incubations: NaCl - 128, KCl - 4.7, CaCl₂ - 2.5, KH₂PO₄ - 1.2, MgSO₄ - 2.6, NaHCO₃ - 2.0 and D-glucose - 5.0. The pH of the solution was maintained at 6.8. Exposure of the intestinal explants to the UC process lasted 120 min; time between slaughter and beginning of exposure was less than 5 min.

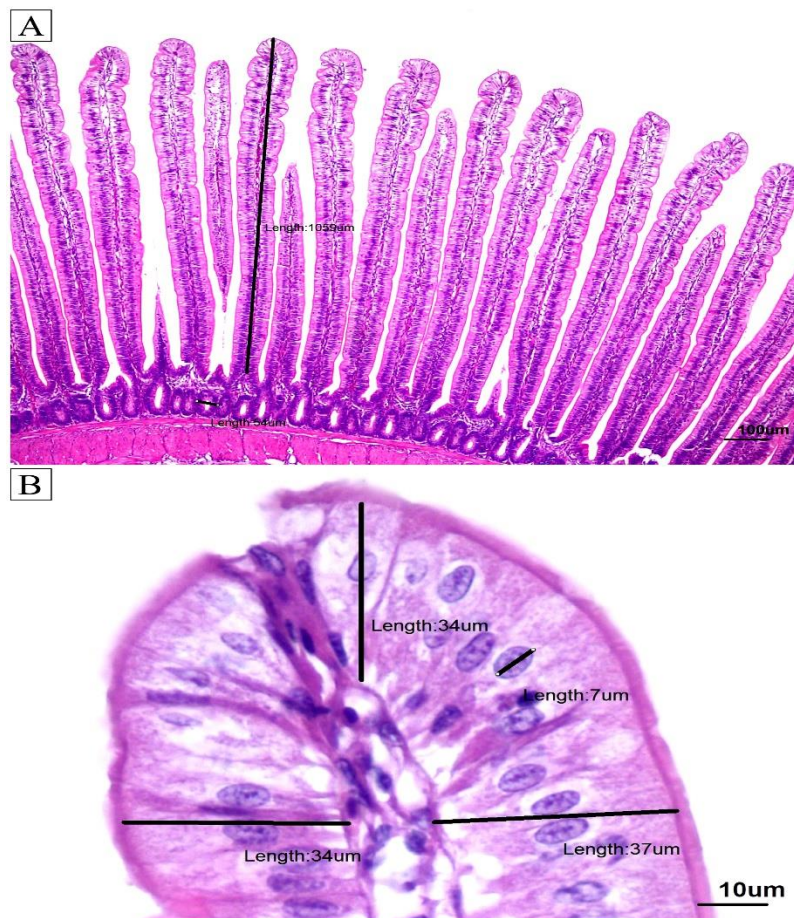
Histopathological analysis

After exposure, the explants were removed from UC and placed in individual recipients containing 10% buffered formalin solution for 24h. Posteriorly, the samples were cleaved, dehydrated in ethanol series, cleared with xylene and embedded in paraffin to obtain the paraffin blocks. Then, each block was serially cut into 5 µm-thick sections and stained with hematoxylin and eosin. Additional histological sections were prepared to evaluate cytoplasmic vacuolization of enterocytes using the alcian blue-periodic acid Schiff (AB-PAS) protocol.

The parameters analyzed in the histomorphometric assessment of the intestinal samples were: villi number (measured in 2000 μm length), villi height, crypts diameter, villi height/crypts diameter ratio, height of apical enterocytes and size of their nuclei, score of villi integrity and score of cytoplasmic vacuolization of enterocytes at the villus tips.

Ten villi presenting the base clearly embedded in the submucosa, with no discontinuity or folds, and simple columnar epithelium at the tip were selected to perform the measurements. The diameter of the crypt closest to the measured villus was taken. Height of enterocytes and size of their nuclei were measured in three regions at the apex of ten villi (lateral sides and tip). The villi were not considered when assessing height of enterocyte, and size of the nucleus was measured in its major axis (Figure 1).

Figure 1. Histological parameters measured in intestinal epithelial explants of 21-day-old broiler chickens.



(A) Villus height and crypt diameter. (B) Enterocyte height (villus lateral sides and tip) and nucleus diameter. Hematoxylin and eosin staining. 4x (A) and 40x (B) magnification.

The following criteria were applied to evaluate microvilli integrity: (0) intact microvilli, (1) slightly shortened microvilli, (2) severely shortened microvilli, and (3) absence of microvilli. Cytoplasmic vacuolization of enterocytes at the villus tips was classified according to these criteria: (0) absence of vacuolization, (1) presence of few vacuoles (lacy in appearance), (2) moderate amount of vacuoles, and (3) large amount of vacuoles. Images were obtained with magnification objectives ranging from 4x to 40x, according to the structure, using a trinocular optical microscope equipped with a digital camera.

Immunohistochemical analysis – Caspase 3 (CASP3)

Immunohistochemistry was performed on serial paraffin 0.4- μ m sections of each block mounted on positively-charged slides (Immuno-Slide-EasyPath[®], USA). Tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a series of graded alcohols to distilled water. The slides were incubated in 10% H₂O₂ and methanol for 10 min to quench endogenous peroxidase.

For antigen retrieval, the slides were immersed in citrate (pH 6) and placed in a pressure cooker at 90°C for 40 min. Tissue sections were treated with 5% skimmed milk (Molico[®], Nestlé, São Paulo, SP, Brazil) diluted in distilled water for 30 min to reduce the unspecific bonds (background). Sections were then incubated with rabbit polyclonal antibody to CASP3 (Biorbyt, USA) diluted at 1:300 in phosphate buffered saline (PBS) overnight. Next, detection was performed using polymer kit MAC4 and AEC chromagen (DAKO[®], USA). Sections were counterstained with Harris hematoxylin and mounted under coverslips using a synthetic resin. Positive controls consisted of liver tissue from a bovine poisoned by the plant *Cestrum intermedium*. For negative controls, the same tissues had primary antibody replaced by PBS. Following labeling with CASP3, the slides were digitalized and the stained areas were measured using the 3DHistech quantification software (3DHistech Ltd., Budapest, Hungary).

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using SAS software (SAS Institute, Cary, NC). For Experiment 1, data were subjected to ANOVA using the F Test at 5%. For Experiment 2, mean differences among treatments were separated using Tukey's HSD test.

Results and Discussion

Experiment 1

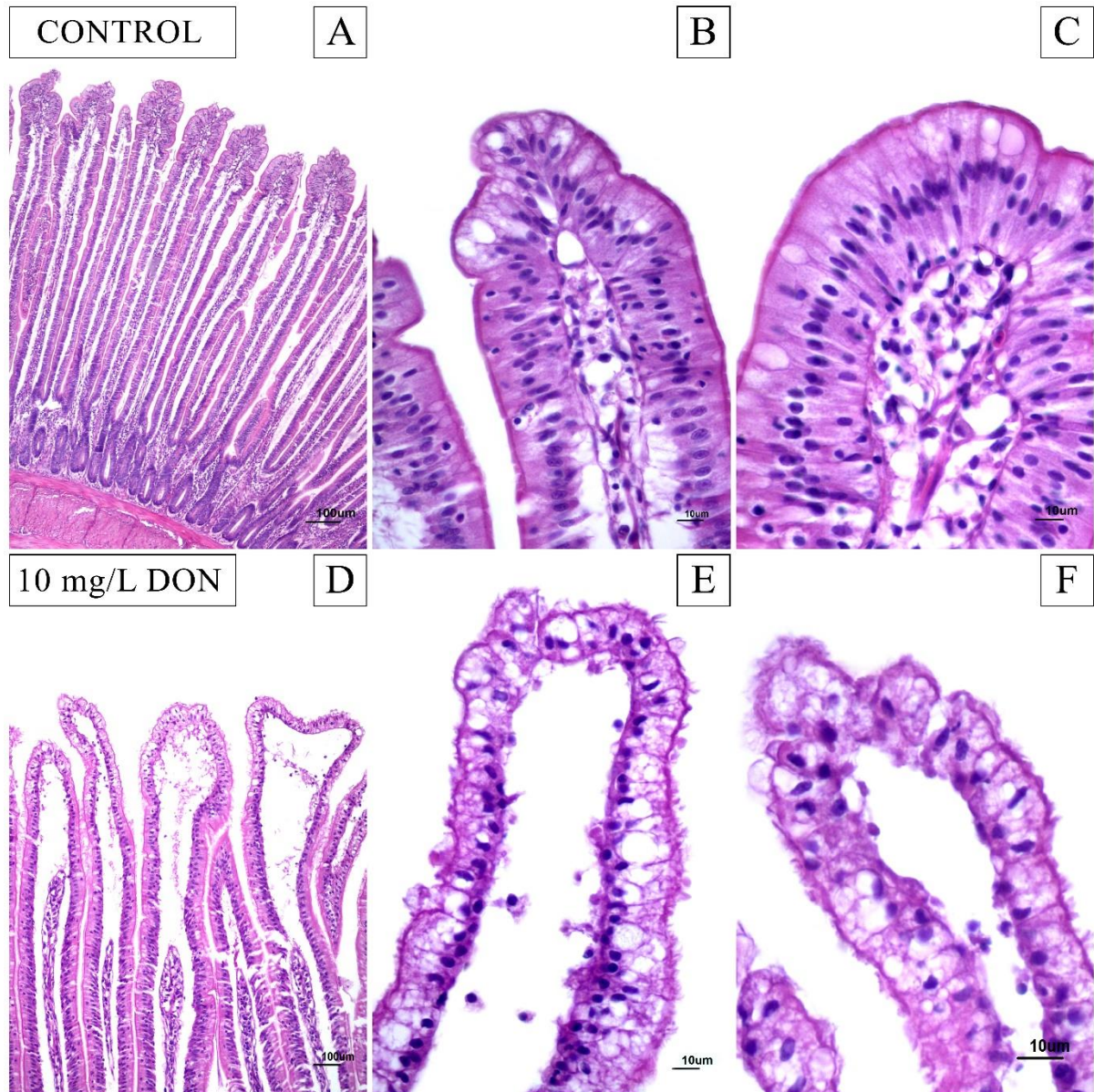
Table 1 displays the data concerning the negative effects of DON on the intestinal epithelium. DON-exposed explants showed intense cytoplasmic vacuolization of enterocytes, lymphatic vessels dilatation, lamina propria edema, reduced enterocyte size and presence of nuclei with reduced size as well as dense chromatin (Figures 2 and 3). Such effects are compatible with the degenerative phase that precedes cell death and have already been described for DON (Pestka et al., 2004).

Table 1. Effect of deoxynivalenol (DON) inclusion on histopathological and immunohistochemical parameters measured in intestinal explants from broilers subjected to the Ussing Chamber process for 120 min.

Parameters	Treatments		p value	SEM
	Control	10 mg/L DON		
Villi number (in 2000 μm)	18.45	17.60	0.0869	0.241
Villi height (μm)	891.47	904.48	0.2412	6.550
Crypts diameter (μm)	49.06	50.44	0.5074	0.436
Villi height/crypts diameter ratio	18.78	18.18	0.0619	0.178
Enterocyte height (μm)	31.23 ^a	23.50 ^b	0.0001	0.363
Enterocyte nucleus size (μm)	6.27 ^a	5.59 ^b	0.0001	0.033
Cytoplasmic vacuolization of enterocytes (score)	1.40 ^b	2.28 ^a	0.0001	0.137
Microvilli integrity (score)	0.45 ^b	1.76 ^a	0.0001	0.168
Immunostaining Caspase-3 (immunostained area, μm^2)	33,585 ^b	69,451 ^a	0.0001	5,878

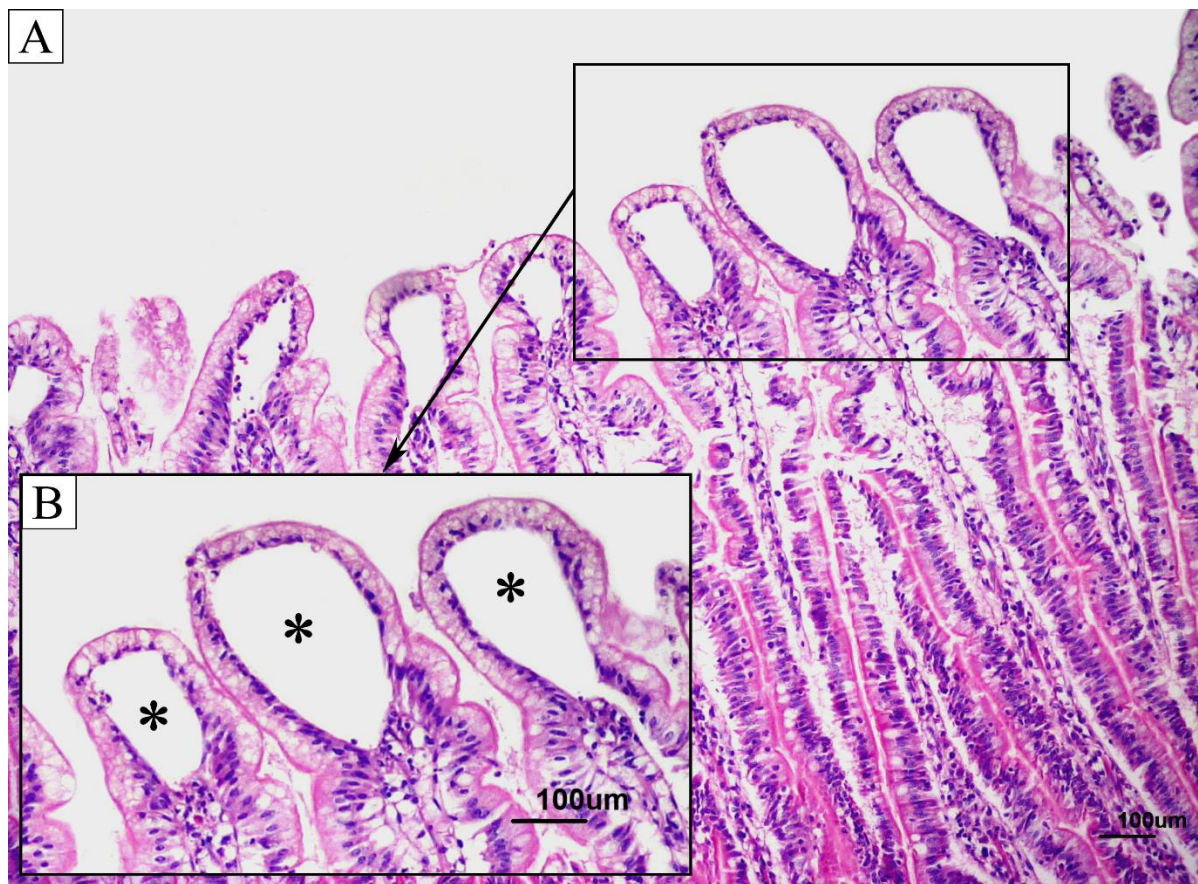
SEM=standard error of the mean. ^{a>b}means with different letters between columns differ significantly by F Test at 5%.

Figure 2. Histological sections of intestinal villi in explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L or buffer solution only (Control) for 120 min.



Reduction in height of enterocytes, lamina propria edema, lymphatic vessels dilatation, reduction in size of nuclei, nuclei displacement toward the basal end of the enterocytes and cytoplasmic vacuolization are observed in DON-treated villi (D and E) comparing to control samples (A and B). Damaged (F) and preserved (C) villi in DON-exposed and unexposed explants (Control), respectively. Hematoxylin and eosin staining. 4x (A), 10x (D) and 40x (B, C, E and F) magnification.

Figure 3. Histological sections of intestinal villi in explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L for 120 min.



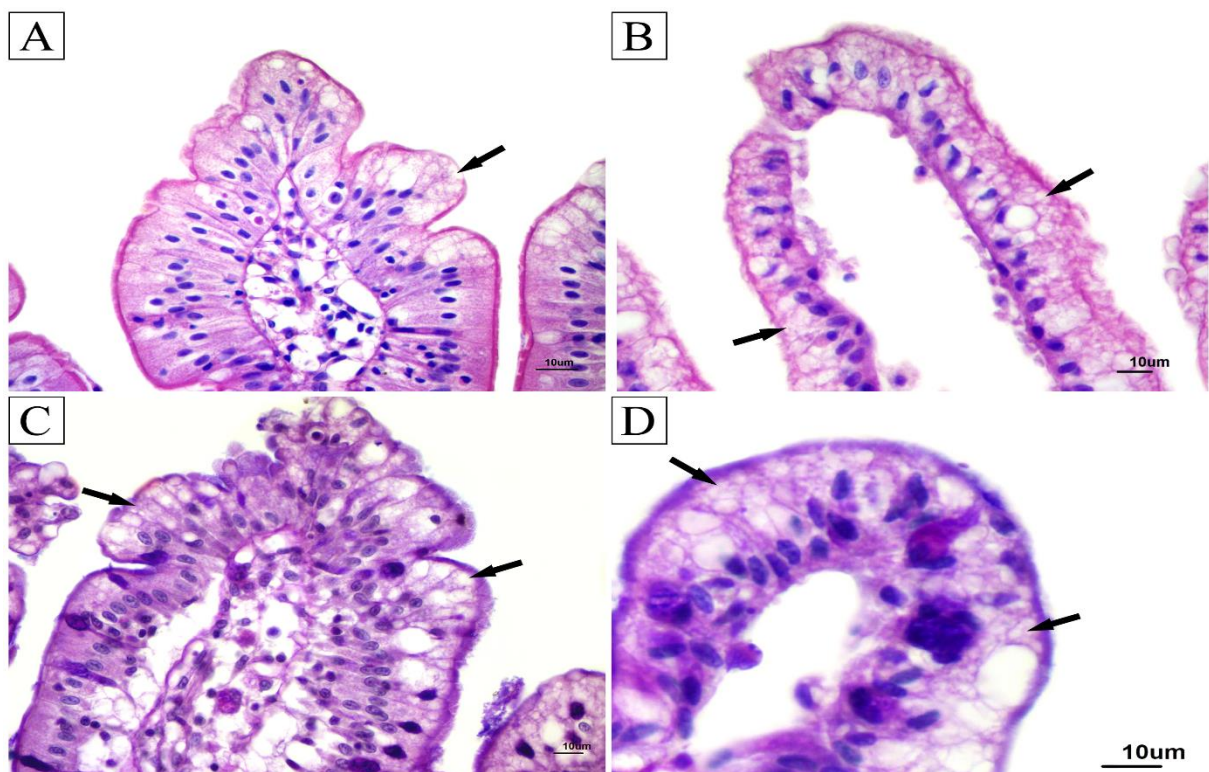
(A) Jejunal villi exposed to DON. (B) Magnified image of the villus tips showing lymphatic vessels dilatation (asterisks), lamina propria edema, enterocyte flattening and detachment. Hematoxylin and eosin staining. 4x magnification.

Kolf-Clauw et al. (2009) were the first to develop a pig jejunal explants culture and to apply such model to assess histological lesions caused by DON; the authors noticed the following dose-related lesions: enterocytes with pyknotic nuclei, flattening and coalescence of villi, edema and necrosis within the lamina propria and a great number of apoptotic cells.

The present study also found intense apical denudation of villi in DON-exposed segments (Figure 2). These lesions may be attributed to the gastrointestinal toxicity of DON and to the mitogen activated protein kinases (MAPK), which modulate apoptosis and apical lyses of enterocytes. Such effect was attributed to DON in *in vivo* and *ex vivo* tests performed in pigs (Lucioli et al., 2013; Garcia et al., 2018).

The intestinal segments subjected to DON showed extensive cytoplasmic vacuolization (Figure 4). Two hypotheses have been formulated to determine the origin of these vacuoles. The first states that DON triggers changes in the intestinal epithelium integrity, which directly influence cell adhesion proteins and cell membrane integrity (Osselaere et al., 2013; Awad and Zentek, 2015); the result is increased intestinal permeability and leakage of the buffer solution used in the current trials into the enterocytes. The second considers the vacuoles as a result of excessive mucus secretion from goblet cells aiming to protect the epithelium against DON-induced damage. So, the AB-PAS technique was performed to test the later hypothesis; there was no staining of vacuoles (Figure 4), thus reinforcing the first hypothesis.

Figure 4. Histological analysis of cytoplasmic vacuolization of enterocytes in explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L or buffer solution only (Control) for 120 min.



Hematoxylin and eosin staining of villi in control (A) and DON-exposed (B) explants showing focal and diffuse vacuoles in the cytoplasm of enterocytes, respectively (arrows). Alcian blue-periodic acid Schiff staining of villi in control (C) and DON-exposed (D) explants showing no staining of vacuoles (arrows). Hematoxylin and eosin staining. 40x magnification.

The second hypothesis was expected to be discarded, since there is *in vivo* (Bracarense et al., 2012) and *ex vivo* (Basso et al., 2013; Gerez et al., 2015) evidence suggesting that DON causes a reduction in the number of goblet cells in swine intestine. In broiler chickens, Antonissen et al. (2015) studied the impact of DON and/or FBs exposure on the mucus layer of the intestinal barrier as well as on the antioxidant response upon oxidative stress. Ingestion of DON- (4.6 mg DON/kg feed), FBs- (25.4 mg FBs/kg feed) or DON/FBs- (4.3 mg DON and 22.9 mg FBs/kg feed) contaminated diets for 15 days affected the extrinsic component of the intestinal barrier and caused an increase in the epithelial antioxidant mechanism and a reduction in mucus production; such results are broadly in line with those disclosed herein.

In respect to the evaluated histomorphometric parameters, no significant differences were observed in villi height or crypts diameter in the intestinal segments subjected to DON. Likewise, villi number remained unaltered (Table 1).

Awad et al. (2006) were the first to report *in vivo* effects of DON upon the intestinal morphology of broilers. The birds were fed a DON-contaminated diet at 5 mg/kg for 21 days. Zootechnical parameters, as body-weight gain, feed consumption and feed conversion, were not affected; nonetheless, absolute and relative weight of small intestine decreased in the intoxicated broilers, and the microscopic examination indicated a reduction in villi height and width in duodenum. Despite the absence of clinical manifestations and average productivity, the study demonstrated the impact of DON on the intestinal histology of broilers. The fact that DON feeding did not influence the birds' performance is consistent with other findings, thus demonstrating that such animals are relatively tolerant to this toxin (Awad et al., 2011b).

Nevertheless, more recent data associate DON with impairment of intestinal functions in broilers (Awad and Zentek, 2015). DON may reduce villi surface area, interfere with the modulation of nutrient transporters and increase intestinal permeability (Osselaere et al., 2013; Awad and Zentek, 2015). An interesting investigation using experimental *C. perfringens*

infection observed that broiler chickens fed a diet contaminated with DON at 5 mg/kg feed were more prone to develop necrotic enteritis lesions than control animals (Antonissen et al., 2014). In this case, DON acted as a predisposing factor by damaging the intestinal mucosa and allowing leakage of nutrients into the intestinal lumen, thus providing the necessary substrate for bacterial proliferation.

Souza et al. (2020) evaluated the effects of DON (19.3 mg/kg) on the intestine of broiler chickens. Increased adherence of bacteria on the villi, vascular changes, inflammatory infiltrate, interstitial edema, enterocyte cytoplasmic vacuolization and villus atrophy were observed after seven days of ingestion of the contaminated diet. DON also increased the oxidative response and reduced the antioxidant capacity in the liver and the intestine.

Wang and Hogan (2019) recently assessed the effect of DON on performance and intestinal morphometry of broiler chickens in different stages of the growth cycle. The study revealed that these birds are more sensitive to diets contaminated with DON in the later growth stage (22 to 34 days); reduced weight gain, feed consumption and feed efficiency, as well as decreased villi height and crypt depth, were some of the observed changes. Similarly, other *in vivo* (Yunus et al., 2012; Osselaere et al., 2013; Cheat et al., 2015; Gerez et al., 2015; Pierron et al., 2018) and *ex vivo* (Basso et al., 2013; Gerez et al., 2018) investigations performed in poultry and swine have proved DON to cause a reduction in intestinal villi height.

In opposition to such reports demonstrating the impact of DON upon intestinal morphology, the analysis protocol described herein employs a period of time between intestine exposure to the toxin and formalin tissue fixation (120 min) which is shorter than that required for cell turnover to occur (Imondi and Bird, 1966). Thus, there was no time for reorganization of the structure and villus shortening, which would occur after migration of enterocytes from the base to the tips of the villus in order to replace lost cells (Uni et al., 2000). A longer processing period (up to 360 min) was tested, but tissue viability was restricted to 120 min,

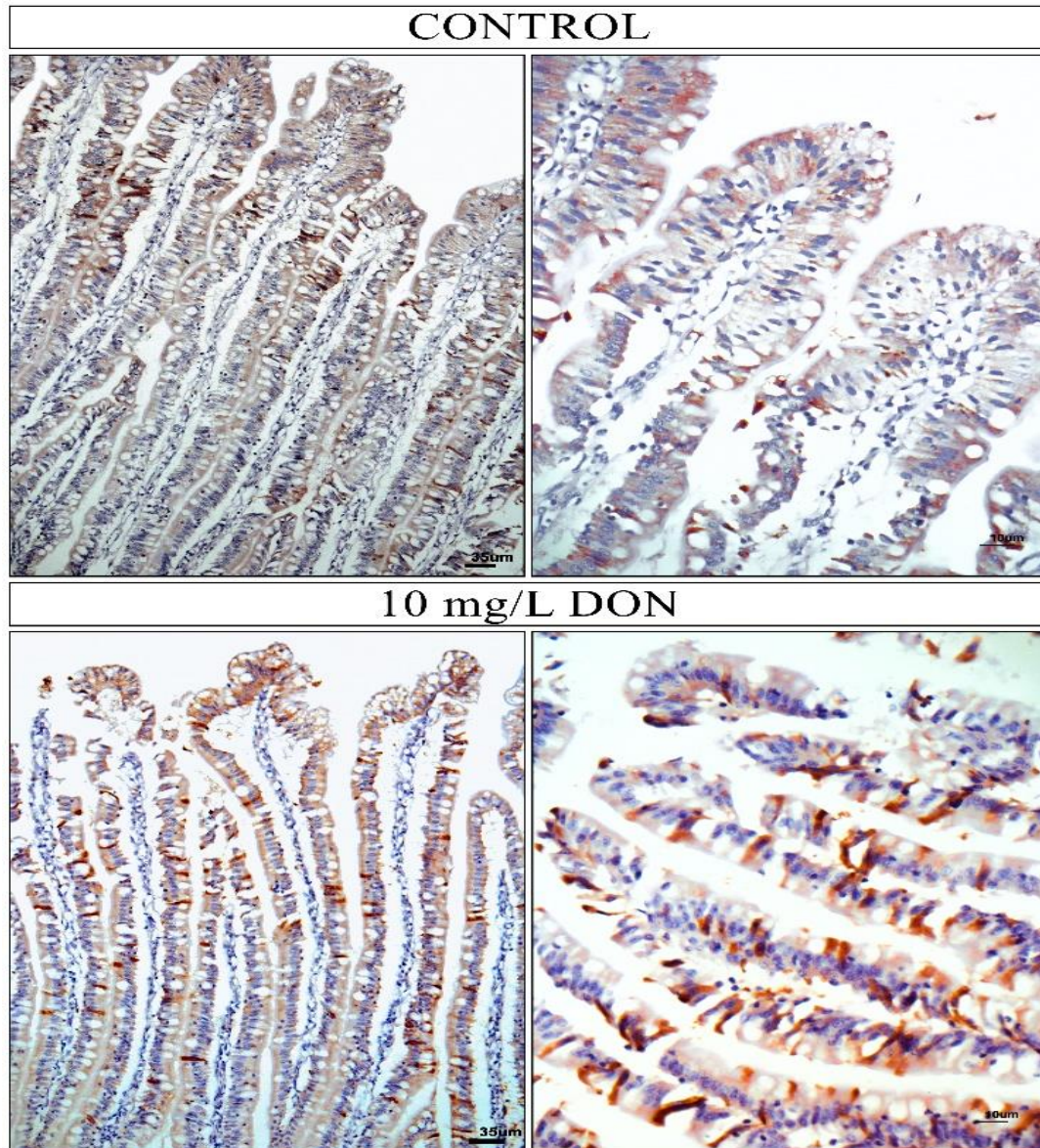
which is in keeping with that disclosed by Zhang et al. (2017) when using intestinal explants of birds.

As regards the immunohistochemical analysis, the intestinal explants subjected to DON presented a higher expression of caspase-3 (Table 1). This analysis demonstrates the damaging effect of DON on the intestinal epithelium and the presence of a significantly greater amount of apoptotic cells in the toxin-exposed group compared to control (Figure 5). A similar pattern of results was obtained by Cheat et al. (2016) in an assessment with pig intestinal segments.

In an *in vivo* experiment with aflatoxin B₁ (AFB₁), Peng et al. (2014) showed the same toxin-induced effect on the intestinal epithelium of broilers. Results indicated that inclusion of AFB₁ at 0.3 mg/kg in the diet triggered an increase in jejunal cell apoptosis, an effect that was attenuated by supplementation of dietary sodium selenite. Such findings are consistent with those seen by Cheat et al. (2016) in swine; enterocytes apoptosis at the villus tips showed a 20% increase in a dose-dependent manner when the intestinal loops were exposed to DON at 10 µM.

The above-mentioned studies involving DON evidence that most researches are conducted in pig, since this is the most sensitive animal to this toxin and represents the most suitable model for extrapolating to humans due to physiological similarities; furthermore, *ex vivo* experimentation is easy to perform in this species (Kolf-Clauw et al., 2009). Nonetheless, Osselaere et al. (2013) evaluated the *in vivo* effect of DON on the small intestine and liver of broilers and demonstrated, for the first time, that the toxin influences oxidative stress and the inflammatory response; in addition, villi height, crypt depth and expression of tight junction proteins in the jejunum and ileum were reduced by exposure to DON.

Figure 5. Immunohistochemical analysis of caspase-3 in intestinal epithelial explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to deoxynivalenol (DON) at 10mg/L or buffer solution only (Control) for 120 min.



Greater number of caspase-3-immunostained cells in DON-exposed explants than in control samples. Immunoperoxidase method. 20x (left images) and 40x (right images) magnification.

Experiment 2

Based on the outcomes obtained in Experiment 1, the second experiment aimed to test the *ex vivo* methodology to assess the efficacy of an AMA. Histopathological findings are shown in Table 2. The AMA allowed to reduce the detrimental effects of DON on the intestinal

villi; moreover, the tested product (T3) did not affect the measured parameters. With reference to the histomorphometric variables, no significant differences were observed in villi number, villi height, crypts diameter and villi height/crypts diameter ratio in the intestinal segments subjected to any of the treatments.

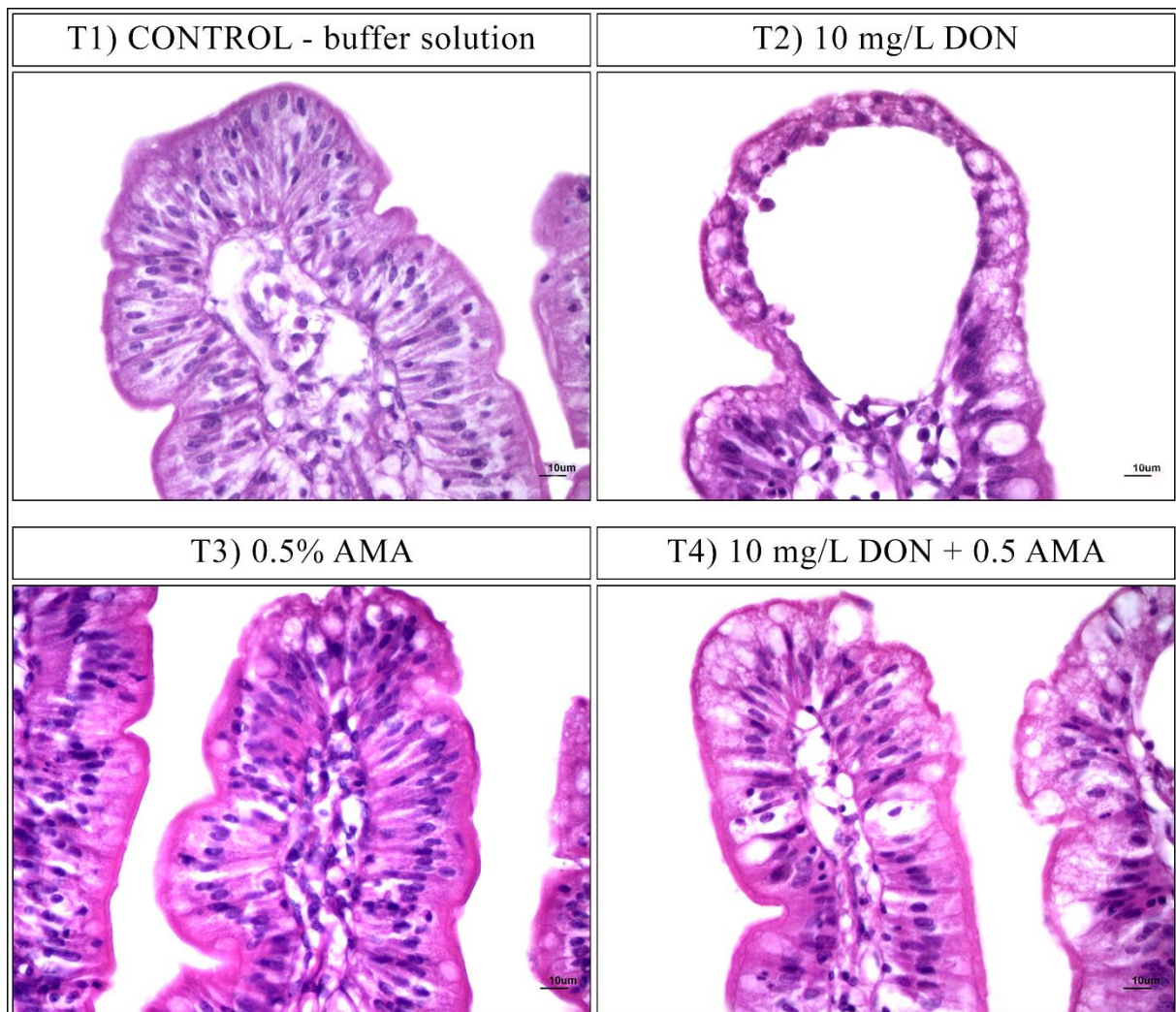
Table 2. Effect of an antimycotoxins additive (AMA) on histopathological and immunohistochemical parameters measured in intestinal explants from broilers exposed to deoxynivalenol (DON).

Parameters	Treatments				p value	SEM
	Control	10 mg/L DON	0.5% AMA	10 mg/L DON + 0.5% AMA		
Villi number (in 2000 μm)	17.42	16.83	17.08	16.58	0.3731	0.235
Villi height (μm)	891.52	910.67	887.98	914.54	0.6437	11.534
Crypts diameter (μm)	52.81	51.97	52.12	53.30	0.8874	0.827
Villi height/crypts diameter ratio	16.90	18.20	17.15	18.06	0.3144	0.334
Enterocyte height (μm)	32.91 ^a	26.91 ^c	32.97 ^a	29.49 ^b	0.0001	0.225
Enterocyte nucleus size (μm)	5.99 ^a	5.08 ^b	5.77 ^a	5.54 ^a	0.0001	0.081
Cytoplasmic vacuolization of enterocytes (score)	1.08 ^b	1.67 ^a	1.08 ^b	1.17 ^b	0.0006	0.076
Microvilli integrity (score)	0.75 ^b	1.50 ^a	0.83 ^b	1.08 ^{ab}	0.0014	0.089
Immunostaining Caspase-3 (immunostained area, μm^2)	34,685 ^c	72,883 ^a	33,102 ^c	46,517 ^b	0.0001	3,879

SEM=standard error of the mean. a>b>c means with different letters between columns differ significantly by Tukey Test at 5%.

Comparing to DON group (T2), treatment containing 10 mg/L DON + 0.5% AMA (T4) mitigated the detrimental influence of the toxin on intestinal integrity. The AMA was able to decrease cytoplasmic vacuolization of enterocytes, maintaining the size of enterocytes' nuclei similar to that seen in the control group, and partially maintain microvilli integrity and size of enterocytes (Figure 6).

Figure 6. Histological sections of intestinal epithelial explants of 21-day-old broiler chickens mounted on Ussing chambers and exposed to T1) buffer solution only (Control), T2) deoxynivalenol (DON), T3) antimycotoxins additive (AMA) or T4) DON+AMA for 120 min to assess the efficacy of the AMA.



T1) preserved villus architecture; T2) lymphatic vessels dilatation, loss of integrity at villus tip and reduced size of enterocytes; T3) preserved villus architecture as in T1; and T4) attenuation of cytoplasmic vacuolization of enterocytes and of loss of epithelial integrity compared to T2. Hematoxylin and eosin staining. 40x magnification.

Immunohistochemistry results indicate that exposure to 10 mg/L DON triggered a greater expression of caspase-3 comparing to control group. As for exposure to 10 mg/L DON + 0.5% AMA, there was a lower expression of caspase-3 when compared to the DON-exposed group. Such findings demonstrate that the AMA counteracted the harmful effect of the toxin

upon the intestinal tissue and reduced the number of apoptotic cells; however, it was not enough to keep the number of cells in apoptosis equal to that registered for the control group.

Regarding the efficacy tests of AMAs, *in vitro* trials used to be conducted to assess the efficacy of a product against a given mycotoxin. Nevertheless, there seems to be no significant correlation between *in vitro* and *in vivo* testing (Vila-Donat et al., 2018). *In vitro* assays have become essential to establish quality control, thus ensuring that the product does not cause significant alterations in the production process of different lots; furthermore, such tests are employed for screening new products (Mallmann et al., 2007).

Studies using *in vitro* techniques are considered a great tool to determine the potential of AMAs to control mycotoxins, and may provide information on the mode of action of the substances. However, such trials do not entirely mimic the *in vivo* gastrointestinal tract conditions and the differences between the target-animals and their metabolism; so, they may not be conducted to demonstrate the efficacy of an AMA under natural conditions (EFSA European Food Safety Authority, 2010).

In contrast, there has been a growing public resistance to animal testing, hence the need for stricter control and reduction in the number of specimens used to this end. In this regard, an *ex vivo* model meets not only the technical requirements, but also the bioethical issues, since it eliminates the detrimental impact of the mycotoxins on living animals (Basso and Bracarense, 2013).

Ileal explants from broilers have also been used to elucidate the regulation of intestinal inflammatory and secretory responses and provide useful evidence for the screening of potential anti-inflammatory substances (Zhang et al., 2017). Thus, such data reinforce the applicability of *ex vivo* testing as a complementary method to assess the efficacy of AMAs for poultry. A single animal may provide multiple explants to be used in *ex vivo* morphological evaluation of organs, which is suitable for toxicity testing (Lalles and Oswald, 2015).

Conclusion

The current *ex vivo* model demonstrated the impact of DON on intestinal epithelium integrity and allowed to observe the histological lesions caused by this toxin in broilers. The lesions reproduced after 120-min exposure to DON are useful to determine the toxin's effect during the early process of cell loss, which will lead to changes in intestinal histomorphometry seen in *in vivo* intoxication. Moreover, it is feasible to apply the *ex vivo* technique as a complementary method to *in vitro* and *in vivo* tests for the evaluation of an AMA's efficacy, thus providing subsidies for decision making about its use, as well as for screening candidate compounds.

CRedit authorship contribution statement

Vinicius Duarte: Conceptualization, Methodology, Investigation. **Adriano Olnei Mallmann:** Formal analysis, Investigation. **Diogo Liberalesso:** Investigation. **Cristina Tonial Simões:** Formal analysis. **Luciane Tourem Gressler:** Writing – Original Draft, Writing - Review & Editing. **Franciéli Adriane Molossi:** Investigation. **Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense:** Writing - Review & Editing. **Carlos Augusto Mallmann:** Conceptualization, Supervision, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Carlos Augusto Mallmann and Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense are grateful for the fellowship of research productivity (PQ) granted by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The authors also thank the Coordination

for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for providing graduate fellowship to Cristina Tonial Simões.

References

- Antonissen, G. et al. The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 1-8, 2014, 10.1371/journal.pone.0108775
- Antonissen, G. et al. The mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic component of intestinal barrier in broiler chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 10846-10855, 2015, 10.1021/acs.jafc.5b04119
- Awad, W. A. et al. Effects of feeding deoxynivalenol contaminated wheat on growth performance, organ weights and histological parameters of the intestine of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 90, n. 1-2, p. 32-37, 2006, 10.1111/j.1439-0396.2005.00616.x
- Awad, W. A. et al. A diet naturally contaminated with the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON) downregulates gene expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 140, p. 72-79, 2011a, 10.1016/j.livsci.2011.02.014
- Awad, W. A. et al. The impact of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol on the health and performance of broiler chickens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 11, p. 7996-8012, 2011b, 10.3390/ijms12117996
- Awad, W. A., Zentek, J. The feed contaminant deoxynivalenol affects the intestinal barrier permeability through inhibition of protein synthesis. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 961-965, 2015, 10.1007/s00204-014-1284-9

- Basso, K. M.; Bracarense, A. P. F. R. L. Explantes teciduais: um modelo redescoberto na experimentação animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3951-3958, 2013, 10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3951
- Basso, K. et al. Deoxynivalenol and fumonisin, alone or in combination, induce changes on intestinal junction complexes and in E-cadherin expression. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2341-2352, 2013, 10.3390/toxins5122341
- Bracarense, A. P. et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p.1776-1786, 2012, 10.1017/S0007114511004946
- Cheat, S. et al. Nivalenol has a greater impact than deoxynivalenol on pig jejunum mucosa *in vitro* on explants and *in vivo* on intestinal loops. **Toxins**, v. 7, p. 1945-1961, 2015, 10.3390/toxins7061945
- Cheat, S. et al. The mycotoxins deoxynivalenol and nivalenol show *in vivo* synergism on jejunum enterocytes apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 87, p. 45-54, 2016, 10.1016/j.fct.2015.11.019
- Cheli, F. et al. Cell-based models for mycotoxin screening and toxicity evaluation: an update. **World Mycotoxin Journal**, v. 7, n. 2, p. 153-166, 2014, 10.3920/WMJ2013.1639
- Cobb-Vantress. Broiler Performance & Nutrition Supplement. Cobb-Vantress Inc., Siloam Springs, AR, 2018.
- EFSA European Food Safety Authority. Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group ‘substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins’. **EFSA Journal**, v. 8, n. 7, p. 1693-1700, 2010, 10.2903/j.efsa.2010.1693

- Garbetta, A. et al. Dose-dependent lipid peroxidation induction on *ex vivo* intestine tracts exposed to chyme samples from fumonisins contaminated corn samples. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 1140-1145, 2015, 10.1016/j.tiv.2015.04.018
- Garcia, G. R. et al. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 983-993, 2018, 10.1007/s00204-017-2083-x
- Gerez, J. R. et al. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 2, p. 89-98, 2015, 10.1016/j.etp.2014.10.001
- Gerez, J. R. et al. Low levels of chito-oligosaccharides are not effective in reducing deoxynivalenol toxicity in swine jejunal explants. **Toxins**, v. 10, n. 7, p. 276-287, 2018, 10.3390/toxins10070276
- Grenier, B., Applegate, T. J. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. **Toxins**, v. 5, n. 2, p. 396-430, 2013, 10.3390/toxins5020396
- Grenier, B. et al. Susceptibility of broiler chickens to coccidiosis when fed subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins - special emphasis on the immunological response and the mycotoxin interaction. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 231-253, 2016, 10.3390/toxins8080231
- Imondi, A. R., Bird, F. H. The turnover of intestinal epithelium in the chick. **Poultry Science**, v. 45, p. 142-147, 1966, 10.3382/ps.0450142
- Kolf-Clauw, M. et al. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 8, p. 1580-1584, 2009, 10.1016/j.tiv.2009.07.015

- Lalles, J. P. and Oswald, I. P. Intestinal Health. In: Niewold T (ed) Techniques for investigating gut function *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* in monogastric farm animals. Netherlands: Wageningen Academic, 2015, pp. 191-209.
- Lucioli, J. et al. The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: Interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. **Toxicon**, v. 66, p. 31-36, 2013, 10.1016/j.toxicon.2013.01.024
- Lucke A. et al. Dietary deoxynivalenol and oral lipopolysaccharide challenge differently affect intestinal innate immune response and barrier function in broiler chickens. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 12, p. 5134-5143, 2018, 10.1093/jas/sky379
- Mallmann, C. A. et al. Correlação entre o desempenho de aditivos anti-micotoxinas (AAM) para aves em testes *in vitro* e *in vivo*. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 9, p. 176-185, 2007.
- Maresca, M. et al. Overview and comparison of intestinal organotypic models, intestinal cells, and intestinal explants used for toxicity studies. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 28, p. 1-18, 2018, 10.1007/82_2018_142
- Morales, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, 2008.
- Osselaere, A. et al. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small intestine. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69014, 2013, 10.1371/journal.pone.0069014
- Oswald, I. P. et al. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 354-360, 2005, 10.1080/02652030500058320

- Peng, X. et al. Protective Roles of Sodium Selenite against Aflatoxin B₁-Induced Apoptosis of Jejunum in Broilers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.11, p.13130-13143, 2014, 10.3390/ijerph111213130
- Pestka, J. J. et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 61-73, 2004, 10.1016/j.toxlet.2004.04.023
- Pierron, A. et al. Deepoxy-deoxynivalenol retains some immune-modulatory properties of the parent molecule deoxynivalenol in piglets. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 11, p. 3381-3389, 2018, 10.1007/s00204-018-2293-x
- Pinton, P., Oswald, I. P. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1615-1643, 2014, 10.3390/toxins6051615
- Randall, K. J. et al. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 267-284, 2011, 10.1007/s10565-011-9187-5
- Rozehnal, V. et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 367-373, 2012, 10.1016/j.ejps.2012.02.025
- Silva, E. O. et al. Phytic acid decreases oxidative stress and intestinal lesions induced by fumonisin B₁ and deoxynivalenol in intestinal explants of pigs. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2019, 10.3390/toxins11010018
- Souza M. et al. Lactobacillus spp. reduces morphological changes and oxidative stress induced by deoxynivalenol on the intestine and liver of broilers. **Toxicon**, v. 185, p. 203-212, 2020, 10.1016/j.toxicon.2020.07.002

- Uni, Z. et al. Small intestinal development in the young chick: Crypt formation and enterocyte proliferation and migration. **British Poultry Science**, v. 41, p. 544-551, 2000, 10.1080/00071660020009054
- Vila-Donat, P. et al. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 246-259, 2018, 10.1016/j.fct.2018.02.044
- Wang, A., Hogan, N. S. Performance effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on broiler chickens: Influences of timing and duration of exposure. **Animal Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 32-40, 2019, 10.1016/j.aninu.2018.08.001
- Yunus, A. W. et al. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Intestinal development, absorptive functionality, and metabolism of the mycotoxin. **Poultry Science**, v.91, n. 4, p. 852-861, 2012, 10.3382/ps.2011-01903
- Zhang, Q. et al. Development of a chicken ileal explant culture model for measurement of gut inflammation induced by lipopolysaccharide. **Poultry Science**, v. 96, p. 3096-3103, 2017, 10.3382/ps/pex160

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO

A avicultura é o setor que apresenta maior velocidade de expansão mundial entre os três principais setores produtivos que integram o complexo carne. A integração entre genética, nutrição, sanidade e ambiência mostraram ser, ao longo dos tempos, o caminho para a obtenção de uma produção altamente viável. Diante disso, a avicultura brasileira possui significativo espaço no mercado mundial, sendo considerado atualmente o segundo maior produtor de carne de frango e o maior exportador mundial. Ao mesmo tempo em que a avicultura brasileira atinge sua consolidação, ela passa por desafios constantes, devido às exigências de qualidade do consumidor e necessidade de melhoria da produtividade (ABPA, 2019).

Na produção de aves, estima-se que cerca de 70% do custo represente a alimentação. A busca constante por dietas que possam proporcionar o máximo desempenho dos animais de forma econômica tem levado profissionais da área a aprimorarem cada vez mais o conhecimento sobre as características dos alimentos. Nesse contexto, é necessário considerar os riscos das micotoxinas, as quais causam prejuízos à produção animal ao contaminarem os grãos, como o milho e trigo, utilizados como ingredientes das rações (MALLMANN et al., 2014).

Diante disso, a inclusão de AAM na dieta tem sido uma importante ferramenta adotada pelas empresas para reduzir os efeitos deletérios das micotoxinas sobre o desempenho dos animais. Ao serem adicionados aos alimentos para animais, os AAM são capazes de adsorver, inativar, neutralizar ou biotransformar as micotoxinas, minimizando o impacto sobre a produtividade do animal (MURUGESAN et al., 2015). Atualmente o mercado oferece uma grande variedade de AAM, mas nem todos apresentam resultados que realmente comprovem sua eficiência protetora. Para tanto, a tomada de decisão ao optar por algum produto deve ser fundamentada em resultados de avaliações do AAM através de testes de adsorção *in vitro* e *in vivo*, que devem ser realizadas em laboratório credenciado pelo MAPA (BRASIL, 2006).

Os testes *in vivo* são essenciais para determinar a eficiência de um AAM, devido à divergência de resultados com os testes *in vitro*. Porém, a utilização dos animais nos testes *in vivo* tem gerado preocupação crescente quanto a aspectos éticos e de bem-estar animal. A legalidade de tais testes é polêmica e comumente promove embates entre parte da comunidade científica que apoia os teste e grupos de defesa dos direitos dos animais. Embora tenham sido despendidos diversos

esforços para encontrar métodos alternativos ao uso de animais, poucos avanços foram obtidos para que fosse possível eliminar essa prática na pesquisa científica. Apesar dos pesquisadores estarem perseguindo esse objetivo, a meta mais realista seria reduzir o número de animais utilizados, associando diferentes técnicas às alternativas já existentes (MORALES, 2008).

No presente estudo foi possível desenvolver uma metodologia *ex vivo* para complementar a avaliação da eficácia de AAM. Além dos testes *in vitro* e *in vivo*, pode-se utilizar um teste *ex vivo* para avaliar produtos e colaborar na tomada de decisão dos fornecedores e empresas sobre a utilização dos AAM, ou até mesmo na triagem de possíveis compostos candidatos ao uso.

Como o modelo *ex vivo* permite o controle e a manipulação do ambiente ao qual o explante será submetido, ele também se presta perfeitamente a uma investigação detalhada da resposta intestinal frente a diferentes micotoxinas e doses utilizadas. No modelo *ex vivo* um único animal dá origem a vários explantes, aumentando, assim, o poder estatístico de qualquer tipo de investigação.

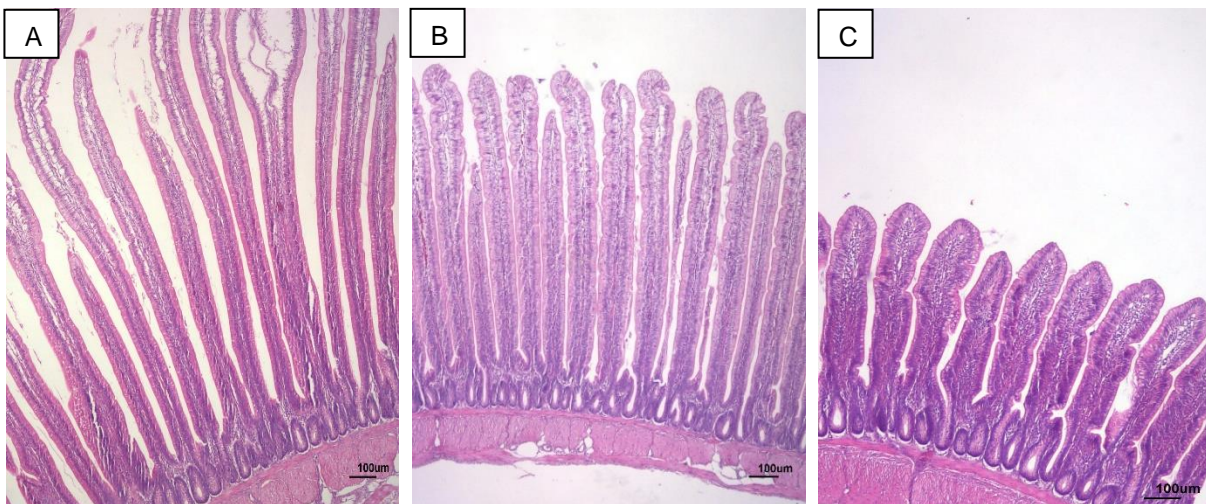
No que diz respeito ao intestino, a cultura do explante foi demonstrada com órgãos de humanos e diferentes animais, incluindo roedores, suínos e aves. Inicialmente, amostras próximas da junção duodenojejunal foram utilizadas, mas atualmente diferentes partes do TGI são exploradas. No entanto, existe uma variabilidade significativa no tempo de viabilidade dos explantes de diferentes regiões do intestino, independentemente da espécie. O intestino grosso em comparação ao intestino delgado apresenta maior tolerância às condições adversas dos estudos, devido à menor taxa de renovação celular que ocorre no intestino grosso. A diferença nos tempos de sobrevivência do tecido também sugere que os explantes do intestino grosso podem ser inerentemente mais resistentes à anóxia e ao estresse oxidativo (RANDALL et al., 2011).

No presente estudo, foram realizados testes de absorção das micotoxinas e testes histopatológicos com os três segmentos intestinais: duodeno, jejuno e íleo. As análises de absorção de AFB₁ obtidas de todos os segmentos intestinais mostraram-se eficazes para demonstrar a absorção da micotoxina nos diferentes tempos de exposição e para avaliar a sua absorção na presença ou não de um AAM.

Já as análises histopatológicas mostraram-se mais eficientes quando foi utilizado o jejuno. Observou-se que as análises obtidas através do uso do duodeno eram de difícil processamento e não permitiam a correta visualização do ápice das

vilosidades, devido à grande concentração e maior altura das vilosidades nesta porção intestinal; ocorria um entrelaçamento das mesmas, impedindo a obtenção de medidas e análises histopatológicas seguras. Já o número de vilosidades nas porções finais do íleo mostrou-se bastante reduzido, dificultando o processo de visualização e mensuração de um número significativo de vilosidades. Portanto, o jejuno demonstrou ser a porção ideal para condução dos testes de absorção e confecção das lâminas para histopatologia (Figura 6).

Figura 4 – Regiões do intestino delgado de frangos de corte utilizados nos testes ex vivo nas câmaras de Ussing.



(A) Imagens histológicas do explante intestinal obtido do duodeno, (B) jejuno e (C) íleo. As imagens, todas no mesmo aumento, mostram que as vilosidades decrescem do duodeno para o jejuno. O maior tamanho das vilosidades duodenais dificulta o processamento das amostras, pois muitas vilosidades se entrelaçam e perdem a configuração natural. As amostras de jejuno foram aquelas que apresentaram melhor aplicabilidade para as análises. Microscópio óptico, aumento de 4x.

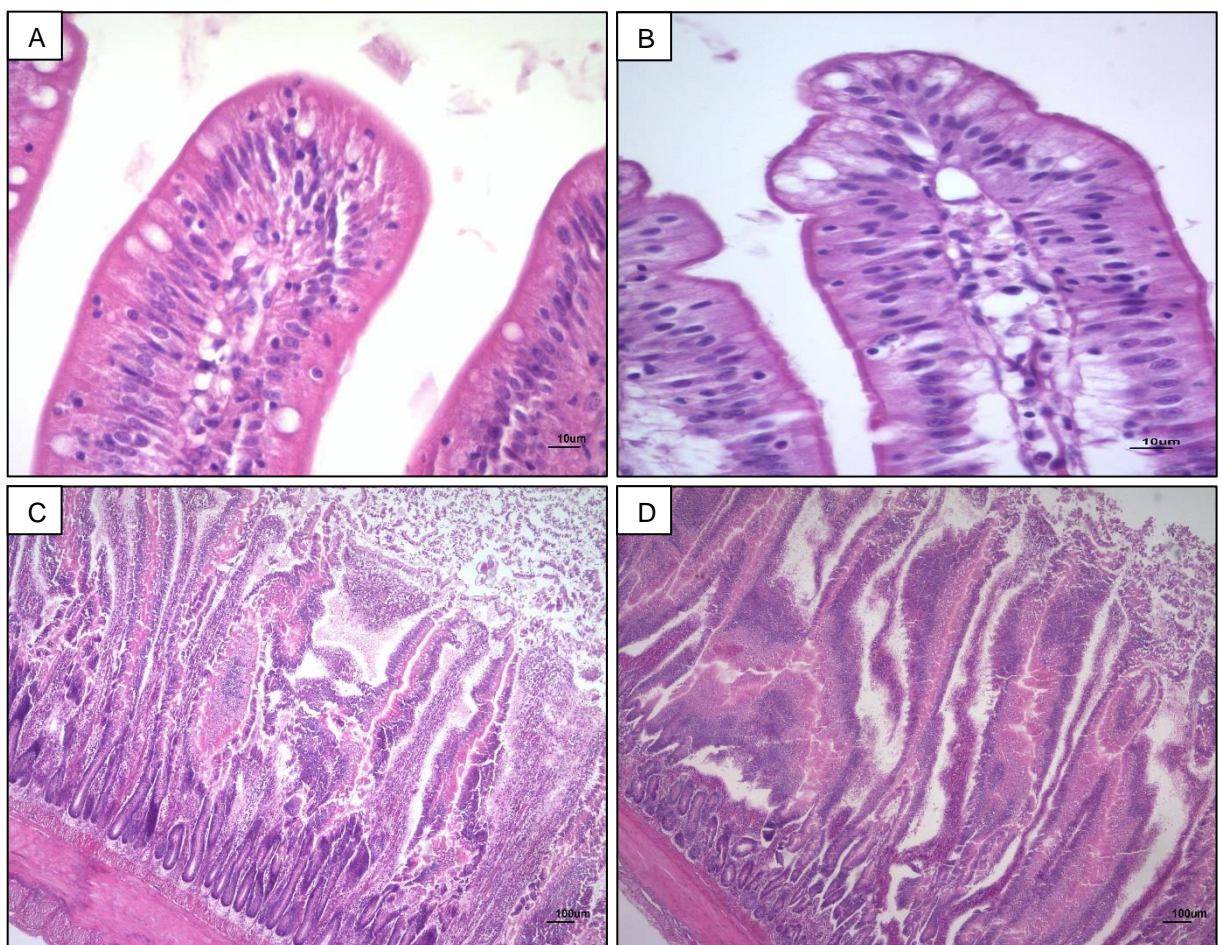
Fonte: (O Autor, 2021).

No desenvolvimento do trabalho constatou-se que a fragilidade do tecido intestinal das aves compromete a tentativa de retirada das camadas seromusculares do intestino e a viabilidade do tecido na câmara de Ussing, não sendo longa o suficiente para reproduzir as lesões causadas pelos micotoxinas em testes *in vivo*. Devido a isso, os testes foram realizados com a mínima manipulação dos segmentos intestinais, observando a absorção da micotoxina pelo segmento intestinal contendo todas as suas camadas, durante 120 min de exposição.

Com relação ao tempo de exposição do explante na câmara de Ussing, foram realizados testes piloto para determinar o tempo ideal de permanência do tecido, considerando a sua viabilidade, a fim de determinar o tempo em que o tecido mantinha

sua estrutura e morfologia intactas e, portanto, viável para os estudos. Para isso, foram realizados testes expondo o tecido na câmara de Ussing, sem nenhuma micotoxina, somente em contato com a solução tampão e demais componentes do sistema que mantém o tecido vivo. O segmento intestinal foi coletado nos tempos, 30, 120, 240 e 360 min, sendo evidenciada a completa deterioração do tecido aos 360 min de exposição (Figura 7).

Figura 5 – Viabilidade dos explantes intestinais conforme o tempo de permanência do tecido na câmara de Ussing.



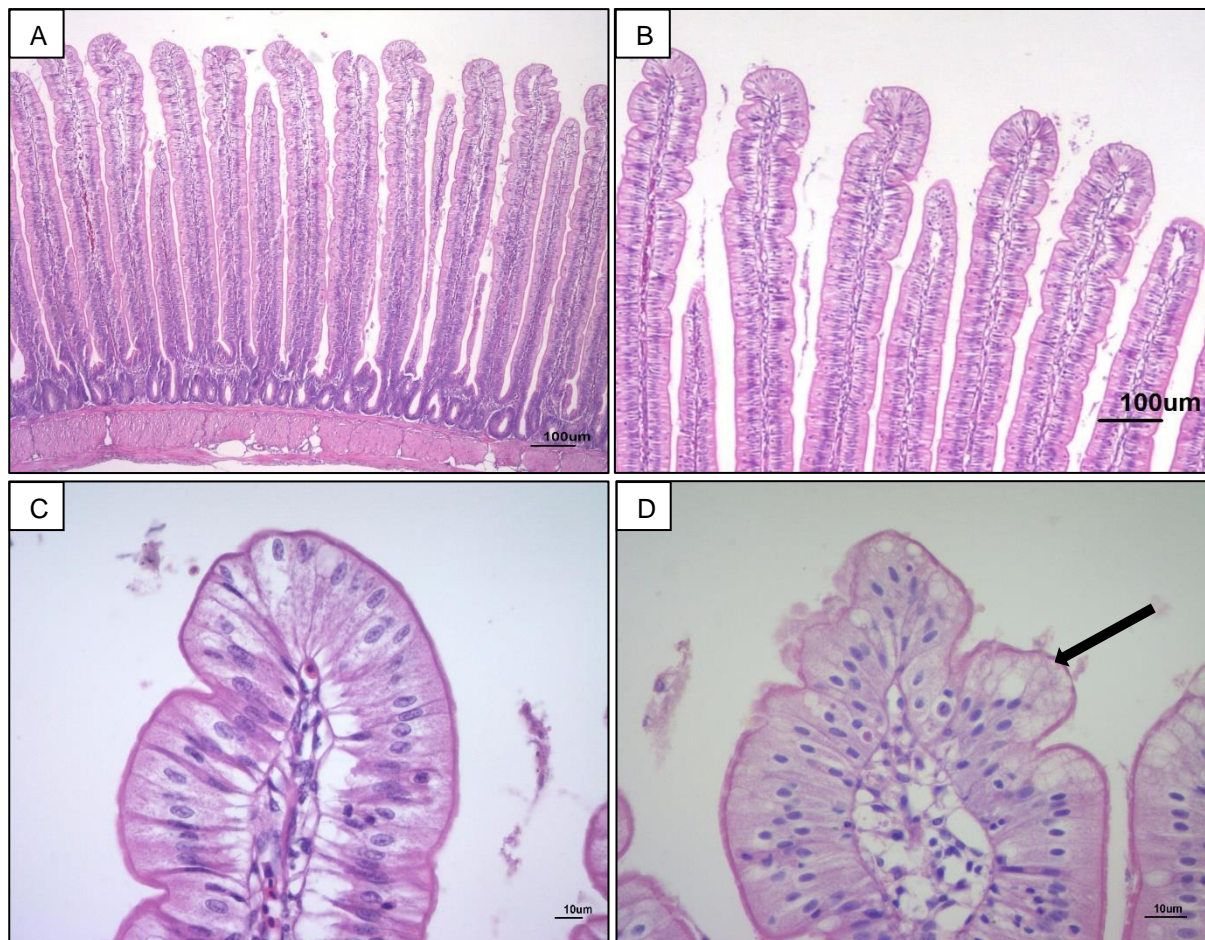
(A) Visualização das vilosidades intestinais após 30 min de exposição do explante intestinal na câmara de Ussing. (B) Vilosidades intestinais após 120 min de exposição. (C) Vilosidades intestinais após 240 min de exposição. Observa-se a perda da conformação do epitélio, principalmente no topo das vilosidades. (D) Vilosidades intestinais após 360 min de exposição. Com esse tempo já há intensa destruição do epitélio intestinal. Microscópio óptico, aumento de 4x (A e B) e 40x (C e D).

Fonte: (O Autor, 2021).

Os segmentos intestinais apresentaram certa viabilidade até 240 min de exposição; após 120 min, foi possível observar perda de ápice de vilosidades, havendo uma alta variabilidade de intensidade das lesões entre os animais avaliados.

Baseado nesses dados, e associado aos testes de absorção que demonstraram uma boa absorção das micotoxinas pelo intestino aos 120 min, optou-se por utilizar o tecido durante 120 min de exposição nos testes de eficácia dos AAM e nos testes histopatológicos (Figura 8 e Figura 9).

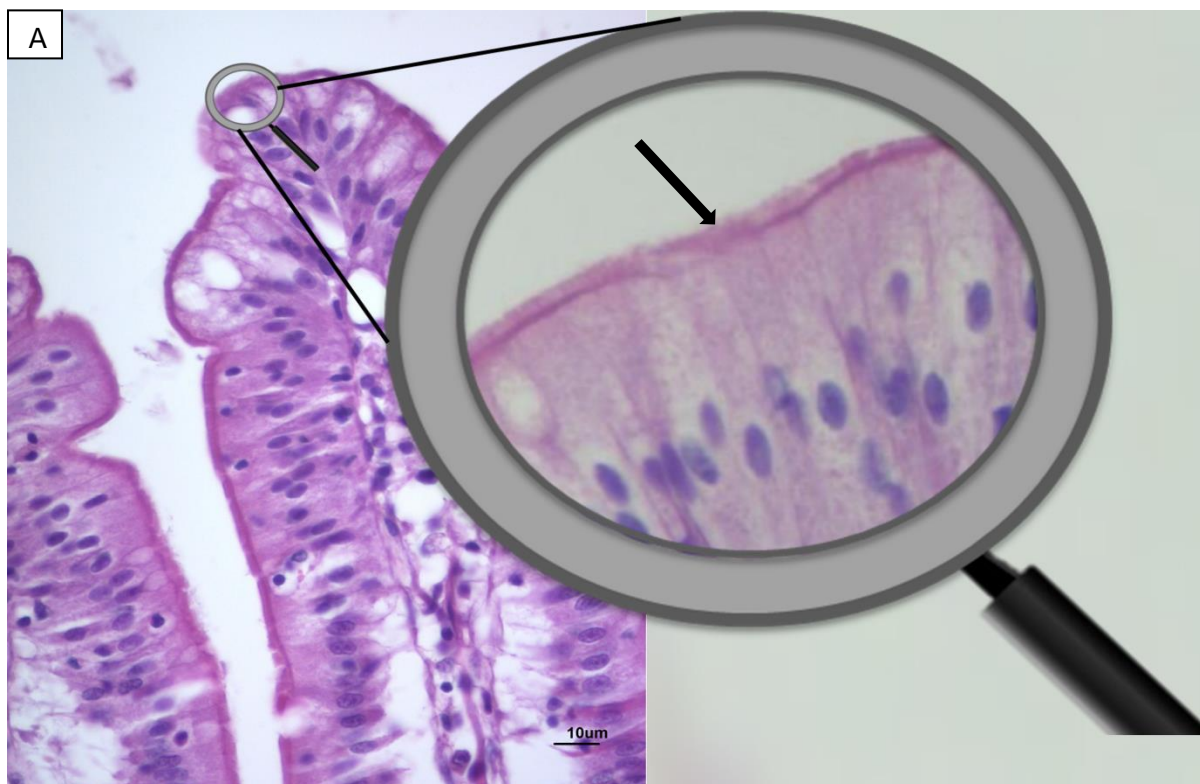
Figura 6 – Imagens histológicas dos segmentos de intestino montados nas câmaras de Ussing durante 120 min, expostos somente à solução tampão.



(A) Visualização das vilosidades do jejuno de aves com 21 dias submetidas à 120 min de exposição à solução tampão na câmara de Ussing. (B) Imagem aproximada demonstrando a integridade das vilosidades intestinais. (C) Imagem do topo da vilosidade mostrando enterócitos, os núcleos dos enterócitos, células caliciformes e lâmina própria. (D) Imagem aproximada do topo de uma vilosidade, mostrando leve vacuolização do citoplasma dos enterócitos (seta preta), visualizada em algumas vilosidades. Microscópio óptico, aumento de 4x (A e B) e 40x (C e D).

Fonte: (O Autor, 2021).

Figura 7 – Detalhe do topo da vilosidade indicando a preservação dos microvilos.



(A) Visualização dos microvilos preservados (seta preta) após 120 min de permanência do explante intestinal na câmara de Ussing. Microscópio óptico, aumento de 40x.

Fonte: (O Autor, 2021).

Com relação às análises para verificação do efeito das micotoxinas sobre o intestino, apesar de não ter sido possível reproduzir o encurtamento das vilosidades visualizado nos testes *in vivo*, no modelo *ex vivo* proposto, as lesões observadas com 120 min de exposição são valiosas para determinar o efeito do DON. Tais lesões caracterizam o início do processo de perda celular, que acarretará posteriormente nas alterações histomorfométricas intestinais visualizadas nas intoxicações demonstradas *in vivo*.

O trato intestinal é a primeira barreira contra antígenos ingeridos, incluindo micotoxinas e bactérias patogênicas. Após a ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas, os enterócitos podem ser expostos a altas concentrações de toxinas (BOUHET; OSWALD, 2005). Os resultados dos testes da metodologia *ex vivo* do presente estudo, demonstraram que foi possível avaliar o impacto do DON sobre as vilosidades e estrutura do epitélio intestinal, sendo esta metodologia uma alternativa viável para avaliar o efeito negativo desta micotoxina sobre o intestino de aves.

CONCLUSÕES

O modelo *ex vivo* de explantes intestinais de frangos de corte montados em câmaras de Ussing, é uma ferramenta viável para complementar os ensaios *in vitro* e *in vivo* utilizados atualmente para avaliar a eficácia de um AAM.

O estudo demonstrado no capítulo 3, o qual avalia o poder de seis AAM em reduzir a absorção intestinal de AFB₁, comprova não haver uma correlação entre os achados *ex vivo* e *in vitro* e também demonstra não ser possível realizar a passagem da micotoxina pelo explante intestinal. Mais estudos são necessários para estabelecer a correlação entre a presente técnica e os resultados *in vivo*.

Espera-se que haja uma correlação positiva entre esses métodos, o que possibilita uma significativa redução nos testes em animais, para avaliação de AAM. Além disso, tal correlação pode permitir o desenvolvimento de experimentos que não são facilmente realizados *in vivo*, como a contaminação de micotoxinas em baixas doses e multicontaminações, o que é uma realidade na área.

Já o estudo evidenciado no capítulo 4, mostra que o presente modelo *ex vivo* é capaz de demonstrar o impacto de DON sobre a integridade do intestino e visualizar as lesões histológicas causadas por esta toxina em frangos de corte. As lesões reproduzidas com 120 min de exposição ao DON, são valiosas para determinar o efeito desta micotoxina no início do processo de perda celular, que acarretará posteriormente nas alterações histomorfométricas intestinais visualizadas nas intoxicações *in vivo*. Além disso, é possível aplicar a técnica *ex vivo* para avaliação complementar da eficácia de um AAM, fornecendo subsídios para a tomada de decisão sobre seu uso, bem como para a triagem de possíveis compostos.

Por fim, o modelo experimental *ex vivo* utilizando intestino de aves montados em câmaras de Ussing mostrou-se uma alternativa viável do ponto de vista econômico, pois a utilização desta técnica representa uma redução dos gastos envolvendo o alojamento e criação dos animais e rapidez na obtenção dos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína animal. **Relatório Anual 2019**. Disponível em: <https://abpa-br.org/relatorios/>. Acesso em: 12 dez 2020.

AFSSA – Agência Francesa de Segurança dos Alimentos. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale; **Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. France**: Maisons-Alfort, 2009. p. 1-308.

ALASSANE-KPEMBI, I. et al. Co-exposure to low doses of the food contaminants deoxynivalenol and nivalenol has a synergistic inflammatory effect on intestinal explants. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 7, p. 2677-2687, 2017.

ALEXANDER, A. N.; CAREY, H. V. Oral IGF-I enhances nutrient and electrolyte absorption in neonatal piglet intestine. **American Journal of Physiology**, v. 277, n. 3, p. 619-625, 1999.

ANTONISSEN, G. et al. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. **Toxins**, v. 6, n. 2, p. 430-452, 2014a.

ANTONISSEN, G. et al. The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis in broiler chickens. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. 1-8, 2014b.

ANTONISSEN, G. et al. Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic component of intestinal barrier in broiler chickens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 10846-10855, 2015.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone-binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic *in vitro* gastrointestinal model. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 10, p. 1283-1290, 2003.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 5, p. 817-824, 2004.

AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent materials for detoxification of Fusarium mycotoxins. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, p. 379–388, 2005.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessment of the multi-mycotoxin-binding efficacy of a carbon/aluminosilicate-based product in an *in vitro* gastrointestinal model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 4810-4819, 2007.

AVANTAGGIATO, G. et al. Assessment of multi-mycotoxin adsorption efficacy of grape pomace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 497-507, 2014.

AWAD, W. A. et al. Effects of deoxynivalenol on general performance and electrophysiological properties of intestinal mucosa of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 12, p.1964-1972, 2004.

AWAD, W. A. et al. Effects of luminal deoxynivalenol and L-proline on electrophysiological parameters in the jejunums of laying hens. **Poultry Science**, v. 84, n. 6, p. 928-932, 2005.

AWAD, W. A. et al. J. *In vitro* effects of deoxynivalenol on small intestinal D-glucose uptake and absorption of deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens. **Poultry Science**, v. 86, n. 1, p. 15-20, 2007.

AWAD, W. A. et al. A diet naturally contaminated with the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON) downregulates gene expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens. **Livestock Science**, v. 140, p. 72-79, 2011.

AWAD, W. et al. The toxicological impacts of the *Fusarium* mycotoxin, deoxynivalenol, in poultry flocks with special reference to immunotoxicity. **Toxins**, v. 5, n. 5, p. 912-925, 2013.

AWAD, W. A.; ZENITEK, J. The feed contaminant deoxynivalenol affects the intestinal barrier permeability through inhibition of protein synthesis. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 961-965, 2015.

BAGLIERI, A. et al. Organically modified clays as binders of fumonisins in feedstocks. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 48, p. 776-783, 2013.

BALIMANE, P. V.; HAN, Y. H.; CHONG, S. Current industrial practices of assessing permeability and P-glycoprotein interaction. **American Association of Pharmaceutical Scientists Journal**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2006.

BASSO, K. M.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Explantes teciduais: um modelo redescoberto na experimentação animal. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3951-3958, 2013.

BOUDERGUE, C. et al. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Mycotoxin-detoxifying agents. CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01. EFSA Supporting Publication, p. 1-192, 2009.

BOUHET, S. et al. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicological Sciences**, v. 77, n. 1, p. 165-171, 2004.

BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 199-209, 2005.

BOUHET, S. et al. Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: *in vivo* and *in vitro* studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 10, p. 1768-1773, 2006.

BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The intestine as a possible target for fumonisin toxicity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 8, p. 925-931, 2007.

BRACARENSE, A. P. et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p.1776-1786, 2012.

BRASIL. Portaria nº 130, 24 de maio de 2006. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento institui o Grupo de Trabalho sobre Micotoxinas em produtos destinados à alimentação animal. **Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil**, Brasília, Distrito Federal, 25 de mai. 2006, seção 2, p. 5, 2006.

BROOM, L. Mycotoxins and the intestine. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 262-265, 2015.

CHEN, X.; NAEHRER, K.; APPLGATE, T. J. Interactive effects of dietary protein concentration and aflatoxin B1 on performance, nutrient digestibility, and gut health in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 95, n. 6, p. 1312-1325, 2016.

CAVRET, S.; LECOEUR, S. Fusariotoxin transfer in animal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 444–453, 2006.

CAVRET, S. et al. Assessment of deoxynivalenol (DON) adsorbents and characterisation of their efficacy using complementary *in vitro* tests. **Food Additives & Contaminants**, v. 27, n. 1, p. 43-53, 2010.

DAKOVIC, A. et al. Influence of natural zeolitic tuff and organozeolites surface charge on sorption of ionizable fumonisin B1. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 272-278, 2010.

DEFERME, S.; ANNAERT, P.; AUGUSTIJNS, P. *In Vitro* screening models to assess intestinal drug absorption and metabolism. In: EHRHARDT, C.; KIM, K. J. **Drug Absorption Studies**. 4. ed. Boston: Springer, 2008. cap. 8, p. 182-215.

DI GREGORIO, M. C. et al. Mineral adsorbent for prevention mycotoxins in animal feed. **Toxin Reviews**, v. 33, n. 3, p. 125-135, 2014.

EC, 2009. European Commission (EC). Commission regulation (EC) N° 386/2009 of 12 May 2009 amending Regulation (EC) N° 1831/2003 of the European Parliament and of the Council as regards the establishment of a new functional group of feed additives. **Official Journal of European Union**, L118, p. 66, 2009.

EC, 2014. European Commission (EC). Commission implementing regulation N° 1115/2014 of 21 October 2014 concerning the authorisation of a preparation of

fumonisin esterase produced by *Komagataella pastoris* (DSM 26643) as a feed additive for pigs. **Official Journal of European Union**, L302, p. 51-53, 2014.

EFSA - European Food Safety Authority. Statement on the establishment of guidelines for the assessment of additives from the functional group 'substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins'. **EFSA Journal**, v. 8, n. 7, p. 1693-1700, 2010.

EFSA - European Food Safety Authority. Guidance for the preparation of dossiers for technological additives. Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed. **EFSA Journal**, v. 10, n. 1, p. 2528-2550, 2012.

FAUCET-MARQUIS, V. et al. Development of an *in vitro* method for the prediction of mycotoxin binding on yeast-based products: case of aflatoxin B₁, zearalenone and ochratoxin A. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p. 7583-7596, 2014.

FENG, J. L. et al. *In vitro* adsorption of zearalenone by cetyltrimethyl ammonium bromide-modified montmorillonite nanocomposites. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 113, p. 99-105, 2008.

GALARZA-SEEBER, R. et al. Leaky gut and mycotoxins: aflatoxin B₁ does not increase gut permeability in broiler chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 3, n. 10, p. 1-8, 2016.

GARBETTA, A. et al. Dose-dependent lipid peroxidation induction on *ex vivo* intestine tracts exposed to chyme samples from fumonisins contaminated corn samples. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 1140-1145, 2015.

GARCIA, J. C. D. R. et al. Evaluation of the cytotoxicity of AFB₁, FB₁ and AFB₁/FB₁ in intestinal cell. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 24, p. 136-141, 2007.

GARCIA, G. R. et al. Intestinal toxicity of deoxynivalenol is limited by *Lactobacillus rhamnosus* RC007 in pig jejunum explants. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 2, p. 983-993, 2018.

GEREZ, J. R. et al. Low levels of chito-oligosaccharides are not effective in reducing deoxynivalenol toxicity in swine jejunal explants. **Toxins**, v. 10, n. 7, p. 276-287, 2018.

GHAREEB, K. et al. Impacts of the feed contaminant deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals: poultry and swine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, p. 327-337, 2015.

GRENIER, B. et al. Biotransformation approaches to alleviate the effects induced by fusarium mycotoxins in swine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 27, p. 6711-6719, 2013.

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

GRENIER, B. et al. Susceptibility of broiler chickens to coccidiosis when fed subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins—special emphasis on the immunological response and the mycotoxin interaction. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 231-253, 2016.

HARPER, A. F. et al. Assessment of a hydrated sodium calcium aluminosilicate agent and antioxidant blend for mitigation of aflatoxin-induced physiological alterations in pigs. **Journal of Swine Health and Production**, v. 18, p. 282-289, 2010.

HASLAM, I. S. Pancreatoduodenectomy as a source of human small intestine for Ussing chamber investigations and comparative studies with rat tissue. **Biopharmaceutics & Drug Disposition**, v. 32, n. 4, p. 210-221, 2011.

HARTINGER, D.; MOLL, W. Fumonisin elimination and prospects for detoxification by enzymatic transformation. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 3, p. 271-283, 2011.

HAYDEN, U. L.; CAREY, H. V. Neural control of intestinal ion transport and paracellular permeability is altered by nutritional status, **American Journal of Physiology**, v. 278, p. 1589-1594, 2000.

HE, L. et al. Use of the Ussing chamber technique to study nutrient transport by epithelial tissues. **Frontiers in Bioscience**, v. 18, p. 1266-1274, 2013.

HEINL, S. et al. Degradation of fumonisin B1 by the consecutive action of two bacterial enzymes. **Journal of Biotechnology**, v. 145, n. 2, p. 120-129, 2010.

HOLTUG, K.; HANSEN, M. B.; SKADHAUGE, E. Experimental studies of intestinal ion and water transport. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 31, n. 216, p. 95-110, 1996.

INSTITUTO SAMITEC - Soluções Analíticas, Microbiológicas e Tecnológicas. 2020. Disponível em: <https://www.samitec.com.br/site/aceso-ao-sistema/aam>. Acesso em: 12 dez 2020.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 342-362, 2007.

KABAK, B.; DOBSON, A. D. W.; VAR, I. Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 8, p. 593-619, 2006.

KOLF-CLAUW, M. et al. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 8, p. 1580-1584, 2009.

KOLOSOVA, A.; STROKA, J. Substances for reduction of the contamination of feed by mycotoxins. A review. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 3, p. 225-256, 2011.

KONG, C.; SHIN, S. Y.; KIM, B. G. Evaluation of mycotoxin sequestering agents for aflatoxin and deoxynivalenol: an *in vitro* approach. **Springerplus**, v. 3, p. 346-351, 2014.

LALLES, J. P.; LESSARD, M.; BOUDRY, G. Intestinal barrier function is modulated by short-term exposure to fumonisin B1 in Ussing chambers. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 8, p. 1039–1043, 2009.

LALLES, J.P.; OSWALD, I.P. Techniques for investigating gut function *in vivo*, *ex vivo* and *in vitro* in monogastric farm animals. In: NIEWOLD, T. **Intestinal health**. 2. ed. Netherlands: Wageningen Academic, 2015. cap 08, p. 191-209.

LAMPEN, A. et al. Metabolism and transport of the macrolide immunosuppressant sirolimus in the small intestine. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 285, p. 1104-1112, 1998.

LE FERREC, E. et al. *In vitro* models of the intestinal barrier. The report and recommendations of ECVAM Workshop 46. European centre for the validation of alternative methods. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 29, n. 6, p. 649-668, 2001.

LESSARD, M. et al. Impact of deoxynivalenol (DON) contaminated feed on intestinal integrity and immune response in swine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 80, p. 7-16, 2015.

LI, Z. et al. Effects of feedborne Fusarium mycotoxins with or without yeast cell wall adsorbent on organ weight, sérum biochemistry, and immunological parameters of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 91, p. 2487-2495, 2012.

LUCIOLI, J. et al. The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: Interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. **Toxicol**, v. 66, p. 31-36, 2013.

MAGNOLI, A. P. et al. Effect of low levels of aflatoxin B-1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. **Poultry Science**, v. 90, p. 48-58, 2011.

MAHFOUD, R. et al. pH-dependent interaction of fumonisin B-1 with cholesterol: Physicochemical and molecular modeling studies at the air-water interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 327-331, 2002.

MALLMANN, C. A. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2006, Campinas/SP. **Anais...** Campinas/SP: Facta - Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2006. p. 213-224.

MALLMANN, C. A. et al. Metodologia de avaliação dos testes de aditivos antimicotoxinas. **Revista Avicultura Industrial**, v. 5, p. 34-40, 2011.

MALLMANN, A. O. et al. Comparison of the efficiency between two sampling plans for aflatoxins analysis in maize. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 35-42, 2014.

MARESCA, M.; FANTINI, J. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. **Toxicon**, v. 56, n. 3, p. 282-294, 2010.

MARESCA, M. et al. Overview and comparison of intestinal organotypic models, intestinal cells, and intestinal explants used for toxicity studies. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 28, p. 1-18, 2018.

MOHAGHEGH, A. et al. Effect of esterified glucomannan on broilers exposed to natural mycotoxin-contaminated diets. **Journal of Applied Animal Research**, v. 45, n. 1, p. 285-291, 2017.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, 2008.

MURUGESAN, G. R. et al. Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1298-1315, 2015.

NEEFF, D. V. et al. 2013. *In vitro* and *in vivo* efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to bind and reduce aflatoxin residues in tissues of broiler chicks fed aflatoxin B1. **Poultry Science**, v. 92, n. 1, p. 131-137, 2013.

NESIC, K. et al. Efficacy of mineral and organic adsorbent in alleviating harmful effects of zearalenone on pigs performance and health. **Acta Veterinaria Belgrade**, v. 58, p. 211-219, 2008.

OSSELAERE, A. et al. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small intestine. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69014, 2013.

OSWALD, I. P. et al. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5870-5874, 2003.

OSWALD, I. P. et al. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food Additives & Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 354-360, 2005.

PAPAIOANNOU, D. et al. The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 84, p. 161-170, 2005.

PHILLIPS, T. D. et al. Reducing human exposure to aflatoxin through the use of clay: A review. **Food Additives & Contaminants**, v. 25, n. 2, p. 134-145, 2008.

PIERRON, A.; ALASSANE-KPEMBI, I.; OSWALD, I. P. Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. **Porcine Health Management**, v. 2, n. 21, p 1-8, 2016.

PIERRON, A. et al. Deepoxy-deoxynivalenol retains some immune-modulatory properties of the parent molecule deoxynivalenol in piglets. **Archives of Toxicology**, v. 92, n. 11, p. 3381-3389, 2018.

PINTON, P. et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, n. 1, p. 41-48, 2009.

PINTON, P. et al. Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junctions proteins and MAPKinases. **Toxicological Sciences**, v. 130, n. 1, p. 180-190, 2012.

PINTON, P.; OSWALD, I. P. Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes on the intestine: a review. **Toxins**, v. 6, n. 5, p. 1615-1643, 2014.

POLITIS, I. et al. Use of *Trichosporon mycotoxinivorans* to suppress the effects of ochratoxicosis on the immune system of broiler chicks. **British Poultry Science**, v. 46, n. 1, p. 58-65, 2005.

RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 267-284, 2011.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 18-46, 2006.

RINGOT, D. et al. *In vitro* biosorption of ochratoxin A on the yeast industry by-products: comparison of isotherm models. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1812-1821, 2007.

ROMERO, A. et al. Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: Protective effect of illite mineral clay. **Toxicology**, v. 353-354, p.21-33, 2016.

ROZEHNAL, V. et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 367-373, 2012.

SANTOS, R. R. et al. Isotherm modeling of organic activated bentonite and humic acid polymer used as mycotoxin adsorbents. **Food Additives & Contaminants**, v. 28, p. 1578-1589, 2011.

SCHATZMAYR, G. et al. Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. **Mycotoxin Research**, v. 19, p. 124-128, 2003.

SCHATZMAYR, G. et al. Microbiologicals for deactivating mycotoxins. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 50, n. 6, p. 543-551, 2006.

SCHNAIDER, T. B.; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 2, p. 278-285, 2003.

SERGENT, T. et al. Molecular and cellular effects of food contaminants and secondary plant components and their plausible interactions at the intestinal level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 813-841, 2008.

SILVA, L. C. **Desenvolvimento e validação de um novo modelo de permeabilidade intestinal *ex vivo* em segmentos de jejuno de ratos para screening de novas moléculas**. 2014. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

SILVA, E. O. et al. Phytic acid decreases oxidative stress and intestinal lesions induced by fumonisin B1 and deoxynivalenol in intestinal explants of pigs. **Toxins**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2019.

SJÖBERG, Å. et al. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 1-2, p. 166-180, 2013.

SMITH, P. L. et al. Routes of delivery: case studies: oral absorption of peptides and proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 8, n. 2-3, p. 253–290, 1992.

SOLÍS-CRUZ, B. et al. Evaluation of chitosan and cellulosic polymers as binding adsorbent materials to prevent Aflatoxin B1, Fumonisin B1, Ochratoxin, Trichothecene, Deoxynivalenol, and Zearalenone mycotoxins through an *in vitro* gastrointestinal model for poultry. **Polymers**, v. 9, n. 10, p. 529-538, 2017.

STREIT, E. et al. Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed - focus on Europe. **Toxins**, v. 4, n. 10, p. 788-809, 2012.

TOMKOVÁ, I. et al. Effect of aflatoxin B1 on CD3 T cells and alkaline phosphatase in the intestine of mice. **Mycopathologia**, v.154, p. 15-19, 2002.

USSING, H. H.; ZERHAN, K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. **Acta Physiologica Scandinavica** v. 23, p. 110-121, 1951.

VANDENBROUCKE, V. et al. The mycotoxin deoxynivalenol potentiates intestinal inflammation by *salmonella typhimurium* in porcine ileal loops. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. 1-8, 2011.

VEKIRU, E. et al. Investigation of various adsorbents for their ability to bind aflatoxin B1. **Mycotoxin Research**, v. 23, p. 27-33, 2007.

VEKIRU, E. et al. Cleavage of zearalenone by *Trichosporon mycotoxinivorans* to a novel nonestrogenic metabolite. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2353-2359, 2010.

VILA-DONAT, P. et al. A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 246-259, 2018.

WANG, J. P.; CHI, F.; KIM, I. H. Effects of montmorillonite clay on growth performance, nutrient digestibility, vulva size, faecal microflora, and oxidative stress in weaning gilts challenged with zearalenone. **Animal Feed Science and Technology**, v. 178, p. 158-166, 2012.

WANG, J. et al. Aflatoxin B₁ induced compositional changes in gut microbial communities of male F344 rats. **Toxicological Sciences**, v. 150, n. 1, p. 54-63, 2016.

WESTERHOUT J. et al. A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, p. 167-177, 2014.

WIELOGÓRSKA, E.; MACDONALD, S.; ELLIOT, C. T. A review of the efficacy of mycotoxin detoxifying agents used in feed in light of changing global environment and legislation. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, n. 3, p. 419-433, 2016.

WIJTEN, P. J.; VAN DER MEULEN, J.; VERSTEGEN, M. W. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 105, n. 7, p. 967-981, 2011.

YIANNIKOURIS, A. et al. Comparison of the sequestering properties of yeast cell wall extract and hydrated sodium calcium aluminosilicate in three *in vitro* models accounting for the animal physiological bioavailability of zearalenone. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.30, n. 9, p.1641–1650, 2013.

YUNUS, A. W. et al. *In vitro* aflatoxin B₁ exposure decreases response to carbamylcholine in the jejunal epithelium of broilers. **Poultry Science**, v. 89, n. 7, p. 1372-1378, 2010.

YUNUS, A. W.; RAZZAZI-FAZELI, E.; BOHM, J. Aflatoxin B₁ in affecting broilers performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. **Toxins**, v. 3, n. 6, p. 566–590, 2011.

YUNUS, A. W. et al. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Intestinal development, absorptive functionality, and metabolism of the mycotoxin. **Poultry Science**, v.91, n. 4, p. 852-861, 2012.