UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

AÇÃO PROTETORA DO LICOPENO SOBRE AS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS MACHOS

TESE DE DOUTORADO

Silvana Peterini Boeira

Santa Maria, RS, Brasil

2014

AÇÃO PROTETORA DO LICOPENO SOBRE AS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS MACHOS

Silvana Peterini Boeira

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR EM FARMACOLOGIA**

Orientadora: Prof. Dra. Ana Flávia Furian
Co-orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

Peterini Boeira, Silvana
AÇÃO PROTETORA DO LICOPENO SOBRE AS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS MACHOS / Silvana Peterini Boeira.-2014.
74 f.; 30cm

Orientador: Ana Flávia Furian
Coorientador: Mauro Schneider Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Estresse Oxidativo 2. Toxicidade de micotoxinas 3. Antioxidantes I. Furian, Ana Flávia II. Schneider Oliveira, Mauro III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

AÇÃO PROTETORA DO LICOPENO SOBRE AS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS MACHOS

elaborada por
Silvana Peterini Boeira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutor em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

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

Ricardo Brandão, Dr. (UFPE)

Marina Prigol, Dra. (UNIPAMPA)

Roselei Fachinetto, Dr. (UFSM)

Gustavo Puntel, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 22 de dezembro de 2014.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Ana Flávia Furian pela amizade, o aprendizado e o voto de confiança em meu trabalho.

Aos professores Mauro Schneider Oliveira, Luiz Fernando Freire Royes e Cristiano Ricardo Jesse pelo apoio científico, estatístico e na construção deste trabalho como um todo.

Aos membros da banca avaliadora Professores Dr. Ricardo Brandão, Dra. Marina Prigol, Dra. Roselei Fachinetto e Dr. Gustavo Puntel as suas valiosas contribuições.

Ao querido colega Vinícius Funck pela paciência, disponibilidade de tempo e ajuda em algumas análises.

A todos os colegas do Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia (LABNEURO) que direta e indiretamente me ajudaram de alguma maneira na conclusão deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Avaliações farmacológicas e toxicológicas aplicadas às moléculas bioativas (LAFTAMBIO PAMPA) que me auxiliaram, apoiaram e participaram da realização de experimentos e discussões. Em especial, agradeço ao Marcelo Gomes de Gomes, Carlos Borges Filho, Lucian Del'Fabbro, Franciele Donato, André Rossito Goes e Leandro Cattelan.

Ao meu colega José Jorge Queiroz Machado Vieira pela compreensão e ajuda em minhas ausências no trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia a oportunidade de fazer parte de seu corpo discente, em especial a Zeli.

A minha família, sobretudo aos meus pais e ao meu noivo, o apoio e incentivo durante toda minha vida.

Muito Obrigada!!

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

AÇÃO PROTETORA DO LICOPENO SOBRE AS ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS MACHOS

Autora: Silvana Peterini Boeira
Orientadora: Ana Flávia Furian
Santa Maria, 22 de dezembro de 2014.

A Zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica tendo, portanto, o sistema reprodutivo como um dos seus principais alvos de toxicidade. Além de ser uma micotoxina toxigênica e imunosupressora, a ZEA altera parâmetros hematológicos e promove um desequilíbrio no sistema oxidativo, especialmente nas enzimas antioxidantes. Assim, o licopeno, um carotenóide com potencial antioxidante, é considerado um dos mais potentes *scavengers* de radicais livres e pode ser utilizado como alternativa terapêutica a fim de reduzir ou impedir os efeitos tóxicos da ZEA. Camundongos Swiss machos foram pré-tratados com licopeno (20 mg/kg, p.o.) por 10 dias consecutivos. No 11° dia foi realizado o tratamento agudo com a ZEA (40 mg/kg, p.o.), e após 48 horas foi realizada a eutanásia dos animais. Analisamos parâmetros reprodutivos, hematológicos, histológicos, inflamatórios e marcadores de estresse oxidativo em amostras de sangue, testículos, epidídimos, rins e fígado dos animais. A ZEA provocou hematotoxicidade através do aumento de leucócitos totais assim como aumento de hemoglobina e hematócrito e diminuiu o número de hemáceas além de linfócitos e plaquetas. Em relação aos parâmetros reprodutivos e hormonais alterações na histologia testicular e diminuição dos níveis de testosterona e da contagem e motilidade espermática foram obervadas. A atividade das enzimas GST (Glutationa-S-transferase), GR (Glutationa Redutase) e ALA-D (Ácido delta aminolevulínico desidratase) foram reduzidas pela ação da ZEA nos testículos. O sistema glutationa foi alterado pela ZEA através da diminuição da glutationa reduzida (GSH) e aumento da glutationa oxidada (GSSG) e da relação GSH/GSSG. Os parâmetros pró-inflamatórios analisados foram aumentados pela ação da micotoxina. O pré-tratamento com o licopeno preveniu o aparecimento dos efeitos tóxicos induzidos pela ZEA em praticamente todos os parâmetros analisados e assim, este antioxidante pode ser utilizado como uma alternativa na prevenção dos danos causados pela ZEA.

Palavras-chave: zearalenona, licopeno, estresse oxidativo, camundongos machos.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Post-Graduation in Pharmacology Program
Federal University of Santa Maria

PROTECTIVE ACTION OF LYCOPENE ON THE CHANGES INDUCED BY MYCOTOXIN ZEARALENONE IN MALE MICE

Author: Silvana Peterini Boeira
Adviser: Ana Flávia Furian
Santa Maria, December22th, 2014.

Zearalenone (ZEA) an estrogenic mycotoxin and, therefore the reproductive system as one of its main targets of toxicity. Besides being a mycotoxin and toxigenic immunosuppressive, the ZEA hematological changes and promotes an imbalance in the oxidative system, especially in antioxidant enzymes. Thus, lycopene, a carotenoid antioxidant potential is considered one of the most potent free radical scavengers and may be used as an alternative therapy to reduce or prevent the toxic effects of ZEA. Male Swiss mice were pretreated with lycopene (20 mg/kg, p.o.) for 10 consecutive days. On the 11th day was held the acute treatment with ZEA (40 mg/kg, p.o.), and after 48 hours was performed euthanasia of animals. We analyzed reproductive, hematological, histological, inflammatory and oxidative stress markers in blood, testes, epididymis, kidneys and livers. ZEA hematotoxicity caused by increased total leukocytes and hemoglobin and hematocrit increased and decreased the number of lymphocytes as well as erythrocytes and platelets. In regard to reproductive and hormonal parameters changes in testicular histology and decreased testosterone levels and sperm motility and count were observed. The activity of GST (Glutathione-S-transferase), GR (Glutathione reductase) and ALA-D (delta aminolevulinic acid dehydratase) was reduced by the action of ZEA in the testes. The glutathione system was amended by ZEA by decreasing the reduced glutathione (GSH) and increased oxidized glutathione (GSSG) and GSH / GSSG. The analyzed pro-inflammatory parameters were increased by the action of mycotoxin. Pretreatment with lycopene prevented the onset of toxic effects induced by ZEA in virtually all parameters and thus, this antioxidant may be used as an alternative to the prevention of damage by ZEA.
Keywords: zearalenone, lycopene, oxidative stress, male mice.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Estrutura química da ZEA. 15
Figura 2 - Representação esquemática da metabolização da ZEA..... 17
Figura 3 - Indução do estrogenismo pela ação da ZEA. 19
Figura 4 - Estrutura química do licopeno 22

ARTIGO 1

Figura 1 - Experimental protocol 29

Figura 2 - Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/Kg, p.o.) on blood cell count. (A) Number of leukocytes, (B) segmented neutrophils, (C) sticks, (D) eosinophils, (E) monocytes), (F) lymphocytes and (G) platelets..... 30

Figura 3 - Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/Kg, p.o.) on (A) number of spermatozoa in epididymis and (B) percentage of motile spermatozoa 31

Figura 4 - Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/Kg, p.o.) on GST activity in (A) liver (B) kidney and (C) testes 31

Figura 5 - Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/Kg, p.o.) on SOD activity in (A) liver, (B) kidney and (C) testes 32

Figura 6 - Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/Kg, p.o.) on CAT activity in (A) liver, (B) kidney and (C) testes 32

Figura 7 - Representative photomicrographs of hematoxylin-eosin stained sections from testis of mice (n = 4 in each group) treated with (A-B) olive oil only, (C-D) lycopene plus olive oil, (E-F) olive oil plus ZEA and (G-H) lycopene plus ZEA..... 33

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1 - Quantidade aproximada de licopeno nos principais alimentos contendo o carotenoide. 23

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido ascórbico
δ-ALA-D	Ácido Delta-aminolevulínico desidratase
CAT	Catalase
CDNB	1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ERS	Receptores estrogênicos
GSH	Forma reduzida da Glutationa
GPX	Glutationa Peroxidase
GR	Glutationa Redutase
GSSG	Forma oxidada da Glutationa
GST	Glutationa -S- transferase
GSTM1	Glutationa -S- transferase isoforma M1
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
3α/3β HSD	3α e 3β hidroxiesteróide desidrogenase
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-1β	Interleucina 1β
LD50	Dose letal 50
MCH	Hemoglobina Corpuscular média
MCHC	Concentração de Hemoglobina Corpuscular média
MCV	Volume Corpuscular médio
MPV	Volume Plaquetário médio
MDA	Malondialdeído
$^1O_2$	Oxigênio singlete

pH	Potencial hidrogeniônico
PLT	Plaquetas
RBC	Red Blood Cell (células sanguíneas vermelhas)
HCT	Hematócrito
HGB	Hemoglobina
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido tricloroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
UDFGT	Glucuronil-difosfato-uridina-transferase1
ZAN	Zearalanona
ZEA	Zearalenona
α -ZOL	α -zearalenol
β -ZOL	β -zearalenol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO **14**
OBJETIVO GERAL **26**
OBJETIVOS ESPECÍFICOS **26**
ARTIGO 1 - Lycopene treatment prevents hematological, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone administration in male Swiss mice **27**
Abstract **28**
Introduction **28**
Material and Methods **29**
Results **31**
Discussion **32**
References **34**
ARTIGO 2 - Lycopene protects against acute zearalenone-induced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice **35**
Abstract **38**
DISCUSSÃO **39**
CONCLUSÕES **48**
PERSPECTIVAS **49**
REFERÊNCIAS **50**

APRESENTAÇÃO

A tese está organizada sob a forma de um artigo e um manuscrito. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos e estão organizados de acordo com a revista científica na qual foram publicado ou submetido.

Os itens discussão e conclusões, encontrados no final desta tese, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados apresentados nos artigos científicos contidos neste trabalho.

As referências bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução e discussão desta tese.

INTRODUÇÃO

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimentos é uma questão de saúde pública em todo o mundo (ANTONISSEN et al., 2014). Estudos têm revelado a existência de, pelo menos, cerca de 400 diferentes micotoxinas (RODRÍGUEZ-CARRASCO et al., 2014), e a ocorrência de micotoxinas em alimentos e derivados não é um problema apenas de países em desenvolvimento. Elas afetam o agronegócio de muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola e, em alguns países, afetando, também, a saúde humana (LEUNG et al., 2006; MALLMANN;DILKIN, 2007).

As micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de fungos (GIMENO, 2010). São produzidas por diversos gêneros de fungos, que contaminam produtos agrícolas em toda cadeia de produção alimentar desde o campo, colheita, transporte e armazenamento (TORRADO et al., 2007). Por estas razões é difícil a adoção de medidas universais para controle de todos estes microrganismos simultaneamente, e também das micotoxinas (CAST, 2003).

A produção de micotoxinas ocorre quando os fungos são submetidos a condições de estresse. Nos grãos armazenados, a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultados da interação complexa entre umidade, temperatura, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e fungos. Em consequência aos riscos tóxicos associados às micotoxinas e a possibilidade de alimentos estarem contaminados por diversos metabólitos em concentrações que variam sazonalmente, legislações que estabelecem limites máximos para a presença de micotoxinas em alimentos tem sido propostas, porém restritas a um pequeno número de compostos (BRASIL, 2011).

As micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo com a eliminação do fungo durante o processamento, as micotoxinas permanecerão no produto final. A

contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou a ração, se torna contaminado por um fungo toxigênico, que em condições adequadas produz as micotoxinas (MONBALIU *et al.,* 2010).

O consumo de produtos vegetais contaminados, assim como o consumo de produtos derivados dos alimentos pode determinar a ingestão de micotoxinas pelos seres humanos e ocasionar as micotoxicoses (ZHU et al., 2014). As micotoxicoses são normalmente sazonais, devido a condições climáticas particulares que favorecem o desenvolvimento das micotoxinas. Algumas micotoxinas são importantes em alimentos devido a sua alta freqüência, como: aflatoxinas, ocratoxina A e zearalenona (ZEA). Esta última em particular é considerada uma micotoxina termoestável, estrogênica e com grande capacidade de contaminar grãos e intoxicar os animais que se alimentam destes.

A ZEA (figura 1) é um sólido cristalino branco, descrita quimicamente como uma lactona e pode ser produzida por várias espécies de *Fusarium*, sendo que *Fusarium graminearum e Fusarium culmorum* são os principais produtores (ZINEDINE, 2007). Estas espécies são conhecidas por colonizarem cereais e mostrarem tendência a se desenvolverem em baixas temperaturas (HAGLER et al., 2001). A denominação zearalenona provém do fungo "*Gibberella zeae*" (forma sexuada do *Fusarium graminearum*), grande produtor desta micotoxina (SOBROVA et al., 2010).

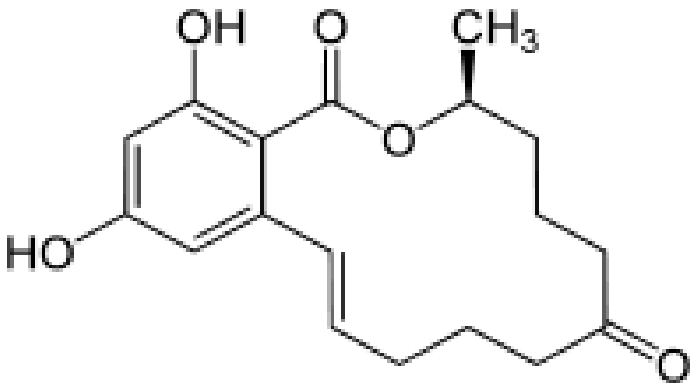

Figura 1: Estrutura química da ZEA

Em 1962, Stob et al. isolaram um metabólito ativo com atividade estrogênica e anabólica a partir de culturas de *G. zeae* (*F. graminearum*). O metabólito ativo encontrado em milho com característica estrogênica foi nomeado zearalenona, anteriormente conhecido como toxina F-2. Assim, a ZEA foi isolada e caracterizada em 1962 devido à síndrome estrogênica que surgiu em suínos alimentados com rações à base de milho contaminado com *Fusarium graminearum* (MÍDIO; MARTINS, 2000).

A ZEA pode ser produzida em substratos diversos, incluindo trigo, cevada, milho, silagem de milho, arroz, sorgo, e, ocasionalmente, nas forragens. No entanto, o milho é o vegetal mais susceptível à contaminação pelos fungos fitopatógenos do gênero *Fusarium* (KUMAR et al., 2008) que produzem uma série de micotoxinas, sendo a ZEA freqüentemente encontrada neste grão (SALAY; MERCADANTE, 2002). A temperatura ótima para a produção de ZEA está entre 12-14°C. Além disso, as variações térmicas que ocorrem entre o dia e a noite também se tornam importantes à produção desta micotoxina. No Brasil, estas condições são observadas principalmente nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

A toxicocinética da ZEA (figura 2) já foi descrita na literatura para alguns animais, incluindo porcos (BIEHL et al., 1993; DÄNICKE et al., 2005; PRELUSKY et al., 1989), frangos (DÄNICKE et al., 2001; OSSELAERE et al., 2013) e ratos (MALLIS et al., 2003; SHIN et al., 2009). A ZEA é absorvida rapidamente após administração oral (AVANTAGGIATO et al., 2003; CAVRET et al.,2006) sendo distribuída principalmente para os órgãos reprodutores, tecido adiposo, tecido intersticial e células dos testículos (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; UENO et al, 1977). Sua metabolização ocorre no fígado por duas vias, a via 1, por hidroxilação; e a via 2, por conjugação ao ácido glicurônico (OLSEN et al., 1981) que inativa a ZEA e seus metabólitos. A via 1 consiste na formação de α- e β- zearalenol (α- e β-ZOL) e zearalanona (ZAN), catalisada pelas enzimas 3α- e 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD). Na via 2 a conjugação da ZEA e de seus metabólitos com ácido glicurônico é catalisada pela glucuronil-difosfato-uridina-transferase1 (UDFGT) (OLSEN et al., 1981; GROMADZKA et al., 2008).

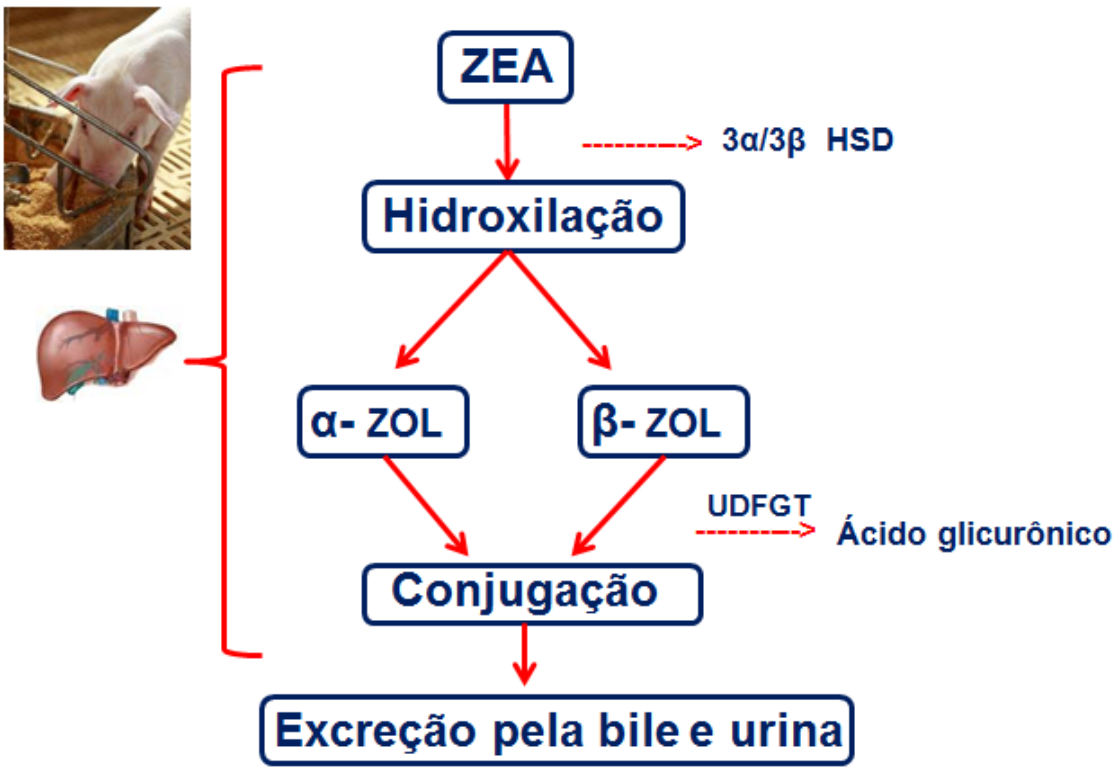

Figura 2: Representação esquemática da metabolização e excreção da ZEA em suínos.

O conhecimento dos mecanismos de biotransformação tem fundamental importância para o entendimento dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda a micotoxinas. Em alguns casos os produtos da metabolização têm toxicidade mais acentuada que o próprio substrato, como é o caso da ZEA (D´MELLO et al., 1999). O metabólito α-zearalenol possui maior potencial estrogênico que a ZEA e que o β-zearalenol (MALEKINEJAD et al., 2006; MIROCHA et al., 1974; MINERVINI et al., 2001), uma vez que possui maior afinidade pela ligação com os receptores de estrogênio (CELIUS et al., 1999). Assim, a hidroxilação da zearalenona para α-zearalenol aparentemente é um processo de ativação, enquanto que a produção de β-zearalenol seria um processo de desativação.Células microssomais hepáticas de suínos produzem maior quantidade de α-zearalenol, que possui maior atividade estrogênica em comparação com β-zearalanol, enquanto microssomas de frango produzem a

maior quantidade de β-zearalenol, que tem menor atividade estrogênica (MALEKINEJAD et al., 2006). Em ratos, a metabolização em α-zearalenol e β-zearalenol é mais lenta quando comparada a porcos e frangos e assim, sugere-se que em ratos, a maior toxicidade é caudada pela ZEA (MALEKINEJAD et al., 2006).

O sistema reprodutivo é um dos principais alvos de toxicidade da ZEA (LI et al., 2014; MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; TIEMANN; DANICKE, 2007). A ação da ZEA ocorre por estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos (figura 3), aumentando a síntese protéica no aparelho reprodutor. Consequentemente, ela estimula a secreção das células endometriais, a síntese de proteínas uterinas e resulta em aumento do peso do trato reprodutivo (GAUMY et al., 2001; KRISZT et al., 2012). Especificamente, a ZEA e seus metabólitos podem interagir diretamente com os sítios de ligação dos receptores citoplasmáticos do hormônio 17β-estradiol e translocar o sítio de ligação destes receptores para o núcleo celular (KATZENELLENBOGEN et al., 1979; KORAICHI et al., 2012). No núcleo, a estimulação do RNA leva a síntese de proteínas e sinais clínicos do estrogenismo. A toxicidade da ZEA têm sido associada com diminuição da fertilidade, redução da ninhada, diminuição do peso da adrenal, tireóide e hipófise na prole, além de alteração nos níveis séricos de progesterona e estradiol (HUEZA et al., 2014).

A ZEA apresenta grandes efeitos sobre a reprodução e a indução do hiperestrogenismo, sendo os suínos a espécie mais sensível à estes efeitos. O estrogenismo em suínos foi relatado em meados da década de 1920 no centro-oeste dos Estados Unidos (MCNUTT et al., 1928), pois a condição de inchaço da vagina nas fêmeas jovens e inchaço do prepúcio em machos foi associada ao consumo de milho mofado. O prolapso vaginal e, ocasionalmente, do reto foram observados como efeitos secundários. Com a substituição do milho mofado por um milho de melhor qualidade micológica, os animais recuperavam-se, mas se a exposição ao milho mofado continuasse observava-se eversão do útero e infecções secundárias que levavam à morte de muitos porcos.

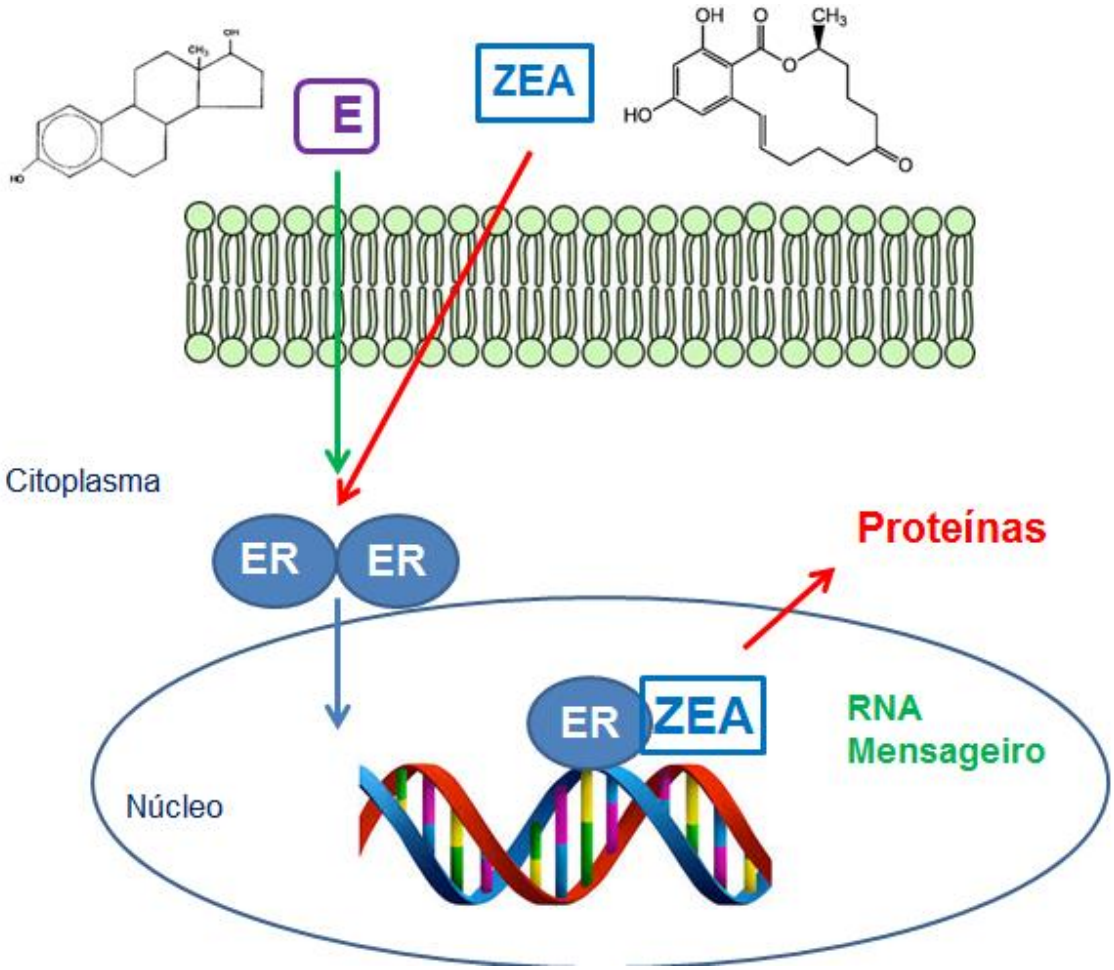

Figura 3: Indução do estrogenismo pela ação da ZEA em receptores estrogênicos citoplasmáticos.

Os estrógenos estão presentes tanto no sistema reprodutor feminino, como no masculino (YANG et al., 2007), e portanto estão envolvidos na estimulação da espermatogênese e síntese de esteróides através da ligação aos receptores de estrógeno (ERs) (RAGO et al, 2006; STABILE et al, 2006). Desse modo, em machos expostos à ZEA, pode ocorrer redução de testosterona sérica, da espermatogênese e do peso dos testículos, além da indução de feminização e redução de libido (D'MELO et al., 1999). Em camundongos tratados com ZEA nas doses de 25, 50 e 75 mg/Kg por 7 dias via intraperitoneal houve aumento da glândula seminal e do peso da glândula prepucial do testículo. Além disso, foi observada uma maior porcentagem de espermatozóides anormais, redução de espermatozóides vivos e de sua

integridade acrossômica, redução na produção espermática e das células espermatogênicas, além da redução da concentração sérica de testosterona (YANG et al., 2007).

A ZEA afeta principalmente o sistema reprodutivo, no entanto, ela pode produzir efeitos adicionais. Têm sido demonstrado que a ZEA e seus metabólitos possuem efeitos deletérios sobre as funções imunológicas nos seres humanos (FORSELL; PESTKA, 1985; VLATA et al., 2006), em bovinos (LIOI et al., 2004), frangos (BORUTOVA et al., 2008; YEGANI et al., 2006), ratos (DORIC et al., 2007; HUEZA et al., 2014) e camundongos (PESTKA et al., 1987). Salah-Abbès et al. (2010) mostraram que a administração de 40 e 80 mg/Kg de ZEA em camundongos Balb/C durante 28 dias provocou redução do peso relativo dos órgãos do sistema imunológico e diminuição do número de linfócitos resultando em atrofia do baço e alteração na produção de citocinas e anticorpos.

A ação hematotóxica da ZEA foi demonstrada nos estudos de Abbès et al. (2006) e Maaroufi et al. (1996), respectivamente, em que camundongos Balb/C e ratos, intoxicados com concentrações superiores a 10 mg/kg de ZEA, observaram disfunção da coagulação, alterações de alguns parâmetros hematológicos como aumento do número das hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e redução do número de plaquetas. Houve ainda redução do número de linfócitos (ABBÉS et al., 2006; BOEIRA et al., 2012) reforçando a capacidade imunossupressora desta micotoxina, e confirmando os resultados encontrados por Berek et al. (2001) que também relatou redução de linfócitos T e B em humanos expostos a ZEA.

O estresse oxidativo, como um elemento indutor do desequilíbrio da homeostase dos organismos vivos, também possui relação com a toxicodinâmica das micotoxinas. Assim, um aumento no estresse oxidativo é considerado um fenômeno importante nos efeitos tóxicos envolvidos na exposição à micotoxinas. Alterações no metabolismo protéico e energético foram descritas em ratos alimentados com dietas contendo níveis elevados de ZEA (SZKUDELSKA, 2002) além de danos oxidativos (ABID-ESSEFI et al., 2011). Além disso, a indução de estresse oxidativo e a alteração do sistema glutationa em células testiculares têm sido relacionados à toxicidade da ZEA.

A glutationa possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo. Estudos têm mostrado que o sistema glutationa, por meio de suas enzimas específicas, é possivelmente desequilibrado pela ZEA resultando em várias alterações, principalmente reprodutivas (SALAH-ABBE` S et al., 2009). Ademais, a GST, uma enzima que catalisa o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutationa (GSH) a xenobióticos eletrofílicos, tem sido associada ao metabolismo dos estrogênios e a sua relevante atuação na espermatogênese (PARK et al., 2003).

Frente à problemática das micotoxinas, atualmente têm-se dado ênfase aos compostos naturais antioxidantes como flavonóides, compostos fenólicos, vitaminas A, C e E bem como os carotenóides. A importância dos carotenóides não é somente atribuída à cor que eles conferem a algumas frutas e vegetais, mas também aos benefícios à saúde, tanto pela atividade pró-vitamínica A que alguns destes compostos apresentam, como pelas suas ações antioxidante e imunomoduladora (RODRIGUEZ-AMAYA, 2002; VALDUGA et al., 2009). Eles removem os radicais peróxidos, modulam o metabolismo carcinogênico, inibem a proliferação celular, estimulam a comunicação entre células, e elevam a resposta imune (CHANG et al., 2014; SHAMI; MOREIRA, 2004). Um dos principais carotenóides correlacionados é o licopeno, que apesar de não ser considerado um nutriente essencial, pesquisas têm demonstrado que este pigmento natural pode trazer diversos benefícios para a saúde humana (LEVY; SHARONI, 2004).

O licopeno (Figura 4) é um pigmento natural lipossolúvel sintetizado por plantas e microorganismos, mas não por animais (PALABIYIK et al., 2013). É caracterizado por uma estrutura simétrica e acíclica de 40 carbonos, cuja massa molecular é de 536,85Da (RODRIGUEZ-AMAYA, 1999) e fórmula molecular $C_{40}H_{56}$ (XIANQUAN et al., 2005). É tido como o carotenóide que possui a maior capacidade scavenger de radicais livres, pois apresenta um conjunto de duplas ligações capazes de oferecer maior reatividade (PRASAD; MISHRA, 2014). O sistema de duplas ligações conjugadas constitui o cromóforo responsável pela sua habilidade de absorver luz na região visível, conseqüentemente pelo seu poder corante, sendo responsável pela coloração

vermelho-alaranjada de vegetais nas quais está presente (NIIZU, 2003; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

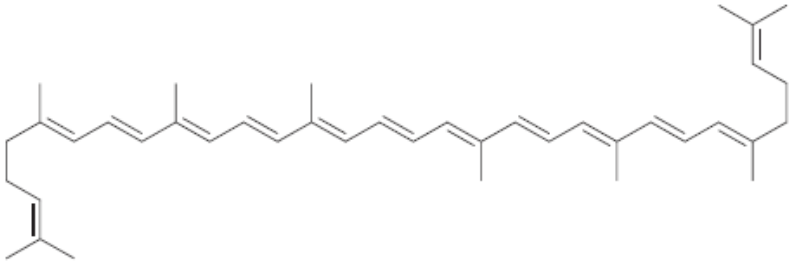

Figura 4: Estrutura química do licopeno

O licopeno é disponível, pela alimentação, através de uma lista não muito extensa de frutas e vegetais (tabela 1), sendo as principais fontes o tomate, a goiaba vermelha, a melancia, o mamão e a pitanga (RAO; AGARWAL, 2000). Apesar de não apresentar a estrutura de anel beta-ionizável que caracteriza a atividade pró-vitamina A (AUGUSTI et al., 2007; PAULA et al., 2004; SETIAWAN et al., 2001), o licopeno é capaz de funcionar como um antioxidante, duas vezes melhor que o beta-caroteno e dez vezes melhor que o alfatocoferol. Além disso, o interesse neste carotenóide vem crescendo rapidamente, devido a estudos que sugerem uma atuação do licopeno na saúde e doenças humanas (CASTEL-BRANCO, 2002; JACOB et al., 2008). Ele tem sido relacionado com a diminuição de risco contra doenças degenerativas, alguns tipos de câncer (cervical, mama, trato digestivo, pele, bexiga e principalmente o de próstata) e doenças cardiovasculares (CHANG et al., 2014; PORCU, 2004; RODRIGUES-AMAYA, 2002; WAN et al., 2014).

ALIMENTO	LICOPENO em mg /100 g
Tomate	0,88 – 4,20
Mamão Papaya	2,00 – 5,30
Goiaba	5,40
Pitanga	2,50 – 7,50
Melancia	2,30 – 7,20

Tabela 1: Quantidade aproximada de licopeno nos principais alimentos contendo o carotenoide.

A estrutura do licopeno é uma chave determinante das suas propriedades físicas, reatividade química e funcionamento biológico. Assim, é razoável postular que quando este carotenóide é consumido, esta mesma propriedade estrutural possa influenciar dramaticamente na biodisponibilidade, absorção, circulação, distribuição para tecidos e disponibilidade para incorporar componentes subcelulares e afetar precisamente processos moleculares. Após ser consumido, o licopeno se incorpora as micelas dos lipídios da dieta e são absorvidos na mucosa intestinal através de difusão passiva, onde se incorporam aos quilomícrons e são liberados para o sistema linfático para serem transportados ao fígado. Assim, o licopeno é transportado pelas lipoproteínas através do plasma para a distribuição a vários órgãos (WALISZEWSKY; BLASCO, 2010).

O processo de metabolização do licopeno é um processo complexo envolvendo uma série de oxidações (KHACHICK et al., 2002). Muitos fatores podem influenciar na biodisponibilidade dos carotenóides, entre eles podem ser citados a matriz alimentar, a quantidade do carotenóide na dieta, a presença de fatores inibidores ou facilitadores da absorção, a forma isomérica em que ele se apresenta, a quantidade e tipo de gordura dietética, o processo de absorção, as interações entre os carotenóides, a presença de fibra alimentar na dieta, o estado nutricional do indivíduo, fatores genéticos, fatores relacionados com o indivíduo e interação entre estas variáveis (CAMPOS; ROSADO, 2005).

Apesar de não ser considerado um nutriente essencial, o licopeno, um carotenóide de ocorrência natural, têm recebido nos últimos anos especial atenção devido a sua atividade antioxidante altamente eficiente e capacidade detoxificadora de radicais livres (ATESSAHIN et al., 2006; COHEN 2002; JONKER et al., 2003). A fundamental atribuição protetora conferida ao licopeno está associada ao seu destacado poder de reação com o oxigênio singlete (MARTÍNEZ et al., 2014; RAO; AGARWAL, 2000).

O licopeno possui uma das mais altas atividades antioxidantes entre os carotenóides sendo capaz de proteger as células contra o radical peróxido de hidrogênio e radicais derivados do nitrogênio, como o dióxido de nitrogênio, além de ser capaz de aumentar os níveis de SOD, GPX e GST (BOSE; AGRAWAL, 2007; BOEIRA et al., 2012). Além disso, estudos demostraram que o licopeno é capaz de atenuar o estresse oxidativo e de exercer efeitos anti-cancerígenos, tanto *in vitro* e *in vivo* (ATESSAHIN et al., 2006, COHEN, 2002; JONKER et al., 2003). Kumar e Kumar, (2009) mostraram que o tratamento com licopeno (2.5, 5 e 10 mg/kg) melhorou significativamente a memória e restaurou a atividade da GST no corpo estriado, hipocampo e no córtex do cérebro após o modelo 3 -NP da doença de Huntington.

O consumo de alimentos ricos em licopeno está associado com menores riscos de câncer, doenças cardiovasculares e outros problemas de saúde (MEKKAWY et al., 2011; YILMAZ et al., 2006). O potencial antioxidante desse micronutriente é capaz de manter a integridade estrutural e funcional de importantes células imunológicas e por sua vez, aumentar a imunidade (EL-DEMERDASH et al., 2004a,b; YOUSEF et al., 2003). Além disso, o licopeno possui atividades anti-inflamatória e anti-coagulante sendo capaz de reduzir a formação de edemas e reparar alterações hematológicas (YAPING et al., 2003). Esses dados corroboram com o estudo de Mekkawy et al., (2011) cuja suplementação com pasta de tomate e/ou vitamina E melhorou os parâmetros hematológicos em peixes expostos à cádmio.

O mecanismo de ação do licopeno no câncer de próstata inclui inibição da proliferação celular, efeito anticrescimento, aumento da comunicação intercelular através do aumento de junções do tipo gap entre as células e modulação da progressão do ciclo celular (CAMPBELL et al., 2004; CANENE-

ADAMS et al., 2005; SILER et al., 2005; TANG et al., 2005). A interação célula a célula via junções do tipo gap é considerada um fator fundamental na homeostase tecidual, sua alteração está associada com o fenótipo neoplásico (LIVNY et al., 2002). Tiuzzi, (2008) observou que o risco para o desenvolvimento de câncer de próstata diminuiu significantemente em homens que consumiram maiores quantidades de produtos a base de tomate.

Sugere-se que o efeito antioxidante do licopeno em células germinais masculinas pode servir como uma intervenção terapêutica promissora para os problemas de infertilidade induzidos pelo estresse oxidativo (TURK et al., 2011). *In vitro*, o licopeno tem efeito antimetastático, sendo um agente antiproliferativo, anticarcinogênico, inibindo assim a adesão, invasão e a migração de células, o que pode reduzir a ocorrência ou a progressão do câncer de próstata (TIUZZI, 2008). Além disso, o licopeno é considerado um potente scavenger de radicais livres e foi demonstrado por Alshatwi, (2010) que a suplementação de ratos Wistar com extrato de tomate é capaz de diminuir a peroxidação lipídica medida pelo nível de malondialdeído (MDA) em amostras de soro e fígado.

Muitos estudos têm demonstrado o papel do licopeno na prevenção de doenças e na carcinogênese (PENNATHUR et al., 2010; MEKKAWY et al., 2011), mas poucos estudos revelam o papel protetor deste frente a injúrias causadas por micotoxinas. Aydin et al., (2013) relataram o efeito protetor do licopeno contra os danos ao DNA induzidos pela ocratoxin-A, enquanto que os resultados de Tas et al., (2010) sugerem que este mesmo carotenóide é capaz de proteger as alterações testiculares em ratos causadas pela aflatoxina B1, no entanto, não há estudos correlacionando a atividade antioxidante do licopeno frente aos efeitos tóxicos da micotoxina zearalenona. Assim, este trabalho configura-se como o primeiro estudo a testar a atividade funcional do licopeno frente aos efeitos tóxicos de uma das micotoxinas de maior relevância micotoxicológica, a ZEA. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a ação protetora do licopeno frente às alterações hematológicas, reprodutivas, oxidativas e hormonais induzidas pela ZEA em camundongos machos.

OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação protetora do licopeno frente às alterações reprodutivas, hematológicas, oxidativas, hormonais e inflamatórias da micotoxina zearalenona em camundongos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar parâmetros hematológicos da série branca e vermelha;
- Determinar parâmetros reprodutivos: contagem e motilidade espermática;
- Realizar análise de histologia testicular;
- Determinar os níveis do hormônio testosterona;
- Determinar parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo;
- Analisar o sistema glutationa: formas reduzida, oxidada e relação;
- Quantificar a nível testicular a enzima Glutationa-S- transferase;
- Determinar parâmetros inflamatórios.

ARTIGO 1

Lycopene treatment prevents hematological, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone administration in male Swiss mice

Silvana Peterini Boeira[a], Carlos Borges Filho[b], Lucian Del'Fabbro[b], Silvane Souza Roman[c],Luiz Fernando Freire Royes[a,d], Michele Rechia Fighera[a,e], Cristiano Ricardo Jessé[b,f],Mauro Schneider Oliveira[a], Ana Flávia Furian[a,g]*

(Artigo publicado na Experimental and Toxicologic Pathology)

a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

b Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, 97650-000 Itaqui, RS, Brazil

c Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim, 99700-000 Erechim, RS, Brazil

d Departamento de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

e Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

f Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil

g Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

Experimental and Toxicologic Pathology 66 (2014) 179–185

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental and Toxicologic Pathology

journal homepage: www.elsevier.de/etp

Lycopene treatment prevents hematological, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone administration in male Swiss mice

Silvana Peterini Boeira[a], Carlos Borges Filho[b], Lucian Del'Fabbro[b], Silvane Souza Roman[c], Luiz Fernando Freire Royes[a,d], Michele Rechia Fighera[a,e], Cristiano Ricardo Jessé[b,f], Mauro Schneider Oliveira[a], Ana Flávia Furian[a,g,*]

[a] Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil
[b] Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, 97650-000 Itaqui, RS, Brazil
[c] Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Campus de Erechim, 99700-000 Erechim, RS, Brazil
[d] Departamento de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil
[e] Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil
[f] Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, 97500-970 Uruguaiana, RS, Brazil
[g] Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 July 2013
Accepted 6 January 2014

Keywords:
Mycotoxin
Spermatozoa
Testes
GST
Carotenoid
Lycopene

ABSTRACT

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin commonly found as a contaminant in cereals. ZEA toxicity targets mainly the reproductive system, and oxidative stress plays an etiological role in its toxic effects. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of lycopene, a potent carotenoid antioxidant, on markers of oxidative stress in liver, kidney and testes, and on reproductive, hematological and histopathological parameters after ZEA administration. Adult Swiss albino male mice received lycopene (20 mg/kg, p.o.) for ten days before a single oral administration of ZEA (40 mg/kg, p.o.), and 48 h thereafter tissues (liver, kidney, testes and blood) were collected for biochemical, hematological and histological analyses. Lycopene prevented ZEA-induced changes in hematological parameters (increased number of leukocytes, segmented neutrophils, sticks, eosinophils and monocytes and decreased number of red blood cells (RBC), number of lymphocytes and platelets). Moreover, lycopene prevented the reduction in the number and motility of spermatozoa and the testicular tissue damage induced by ZEA. In addition, lycopene prevented the decrease in glutathione-S-transferase activity in kidney and testes and increased glutathione-S-transferase activity *per se* in the liver, kidneys and testes as well as superoxide dismutase activity in the liver. In summary, lycopene was able to prevent ZEA-induced acute toxic effects in male mice, suggesting that this antioxidant carotenoid may represent a promising prophylactic strategy against ZEA toxicity.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

1. Introduction

Zearalenone (ZEA) is a fungal toxin produced by the fungi *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* (Placinta et al., 1999; Zinedine et al., 2007). Given ZEA is commonly found in widely-used ingredients for many human and animal food, such as maize, barley, wheat, oats, sorghum and sesame seeds (Schollenberger et al., 2006; Zinedine et al., 2007), the presence of ZEA in food appears as an important health issue, and therefore the study of ZEA toxicity is of fundamental importance for the understanding and management of its toxic effects.

The chemical structure of ZEA resembles that of naturally occurring estrogens (Gromadzka et al., 2008), and in fact this mycotoxin binds to estrogenic receptors (ER) (Boyd and Wittliff, 1978; Greenman et al., 1979). Accordingly, ZEA produces various estrogen-disrupting effects at relatively low concentrations, including infertility, reduced serum testosterone concentrations and sperm counts, enlargement of ovaries and uterus, reduced incidence of pregnancy, and decreased progesterone levels in animals (Zinedine et al., 2007). In this context, the reproductive system has been regarded as a major target of ZEA toxicity (Tiemann and Danicke, 2007; Minervini and Dell'Aquila, 2008). For instance,

* Corresponding author at: Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 43, Sala 4217, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8254.
E-mail address: furian.anaflavia@gmail.com (A.F. Furian).

0940-2993/$ – see front matter © 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2014.01.002

chronic exposure to ZEA caused alterations in the reproductive tract of laboratory (mice, rats and pigs) and farm animals (Minervini and Dell'Aquila, 2008).

In addition to its estrogen-like effects, it has been proposed oxidative stress plays an important role in ZEA toxicity. In fact, it has been demonstrated that ZEA and its metabolites elicit lipid oxidation in several cell lines (Kouadio et al., 2005; Hassen et al., 2007; Othmen et al., 2008), and that acute exposure to ZEA decreased glutathione-S-transferase activity in mice kidney and testes (Boeira et al., 2012). In addition, it has been shown that incubation with antioxidant vitamins A, E or C reduced the formation of DNA adducts induced by ZEA in renal cells (Szkudelska et al., 2002). Altogether, these results reinforce the idea that oxidative stress contributes to ZEA-induced toxicity and suggest that antioxidants could be a potential therapeutic approach to prevent or slow the progression of the toxic effects induced by acute ZEA exposure.

Lycopene, the red pigment of tomato and other red fruits and vegetables, is a carotenoid with high antioxidant potential (Stahl and Sies, 2003). Several studies have suggested lycopene as a potential agent for prevention of some types of cancers, particularly prostate cancer (Giovannucci, 1999; Giovannucci et al., 2002; Shami and Moreira, 2004; Schwarz et al., 2008; Ozten-Kandas and Bosland, 2011). In addition, lycopene has been suggested as an alternative treatment for sperm toxicity after chemotherapy (Atessahin et al., 2005, 2006; Sonmez et al., 2011). Moreover, lycopene also displays protective properties in chronic cardiovascular disorders as well as respiratory and digestive epithelial cancers (Rao, 2002; Voutilainen et al., 2006; Dahan et al., 2008). However, to the best of our knowledge, there is no information available on the potentially beneficial effects of lycopene against ZEA toxicity. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of lycopene on reproductive, hematological, histopathological and oxidative stress parameters in the liver, kidney and testes of male Swiss albino mice following acute exposure to ZEA.

2. Materials and methods

2.1. Animals and reagents

Male Swiss albino mice (25–30 g in weight and 90 days old) were used. Animals were housed in groups of 5 in Plexiglas cages (41 cm × 34 cm × 16 cm) with the floor covered with sawdust. They were kept in a room with light–dark cycle of 12 h with the lights on between 7:00 and 19:00 h and temperature controlled (20–25 °C) and received water and food *ad libitum*.

The animals were maintained and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (process #068/2012) of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

Zearalenone (ZEA), reduced glutathione (GSH), 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), epinephrine bitartrate salt, glycine, trizma base, were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Lycopene was obtained from commercially available capsules (Equaliv Licopeno®; the purity of lycopene in each capsule is 100% and represents 7% of total content and the remaining 93% consist of excipient). All other chemicals were analytical grade from local suppliers. The stain used for the blood smear (Quick Romanowsky) was purchased from Laborclin (Pinhais, PR, Brazil). ZEA and lycopene were dissolved in olive oil, immediately before administration.

2.2. Experimental design and sampling

2.2.1. Treatment

Treatment schedule is depicted in Fig. 1. Mice were weighed and randomly divided in two groups receiving lycopene (20 mg/kg) or olive oil (10 ml/kg) by gavage for ten days. In the eleventh day each group was again randomly divided in two groups receiving ZEA (40 mg/kg – 8% of LD_{50}) or olive oil (10 ml/kg) by gavage. Forty eight hours after ZEA or vehicle administration the animals received a dose of pentobarbital (180 mg/kg, i.p.), and blood was collected by cardiac puncture into tubes containing heparin (1 UI/μl). The liver, kidneys and testes were removed, weighed, and homogenized in Tris–HCl 50 mM pH 7.4 for the determination of enzymatic indicators of oxidative stress. The epididymides were weighed and used for determining the number and motility of spermatozoa. One of the testes was fixed in 10% formalin for histopathological examination, as described below.

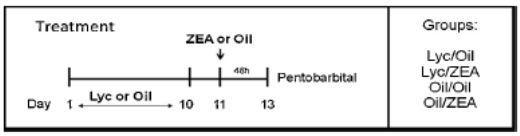

Fig. 1. Schematic presentation of the experimental protocol. Mice were weighed and randomly divided in four groups which received lycopene (Lyc) (20 mg/kg) or olive oil (10 ml/kg) by gavage for ten days. In the eleventh day mice received ZEA (40 mg/kg) or olive oil (10 ml/kg) by gavage. Forty eight hours after ZEA or vehicle administration the animals received a dose of pentobarbital (180 mg/kg, i.p.), and blood and major organs were collected for biochemical and histopathological analysis.

2.3. Blood cells

Total leukocyte count was performed using 25 μl of blood and 500 μl of Turkey solution in a Neubauer chamber with the aid of optical microscope (Nikon Eclipse 50i) at 40× magnification. The same technique was applied for differential counts of neutrophils (segmented and sticks), eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes in blood smears (5 μl of blood). After counts, slides were stained (Quick Romanowsky) and viewed under a microscope according to the method described by Failace et al. (2009). Red blood cells (RBC) were measured using a blood counter (Mindray, BC-2800 Vet model) with adapted dilutions.

2.4. Number and motility of spermatozoa

Assessment of spermatozoa count and motility was performed according to Freund and Carol (1964). Briefly, the cauda epididymides were homogenized in 2 ml of warmed (37 °C) saline solution (0.9% NaCl). An aliquot (10 μl) of the diluted spermatozoa suspension was transferred to a standard hemocytometer counting chamber and was allowed to stand for 5 min. Cells settled in the 5-min period were counted with the help of light microscope (Nikon Eclipse 50i) at 200× magnification.

2.5. Antioxidant enzymes

2.5.1. Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of Habig et al. (1974). The reaction mixture contained a 50 μl aliquot from supernatant (1000 × *g*/10 min/4 °C) of liver, kidney or testes, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene). GST activity was expressed as nmol CDNB/min/mg of protein.

2.5.2. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined in liver, kidney and testes, according to the method described by Misra and Fridovich (1972). Briefly,

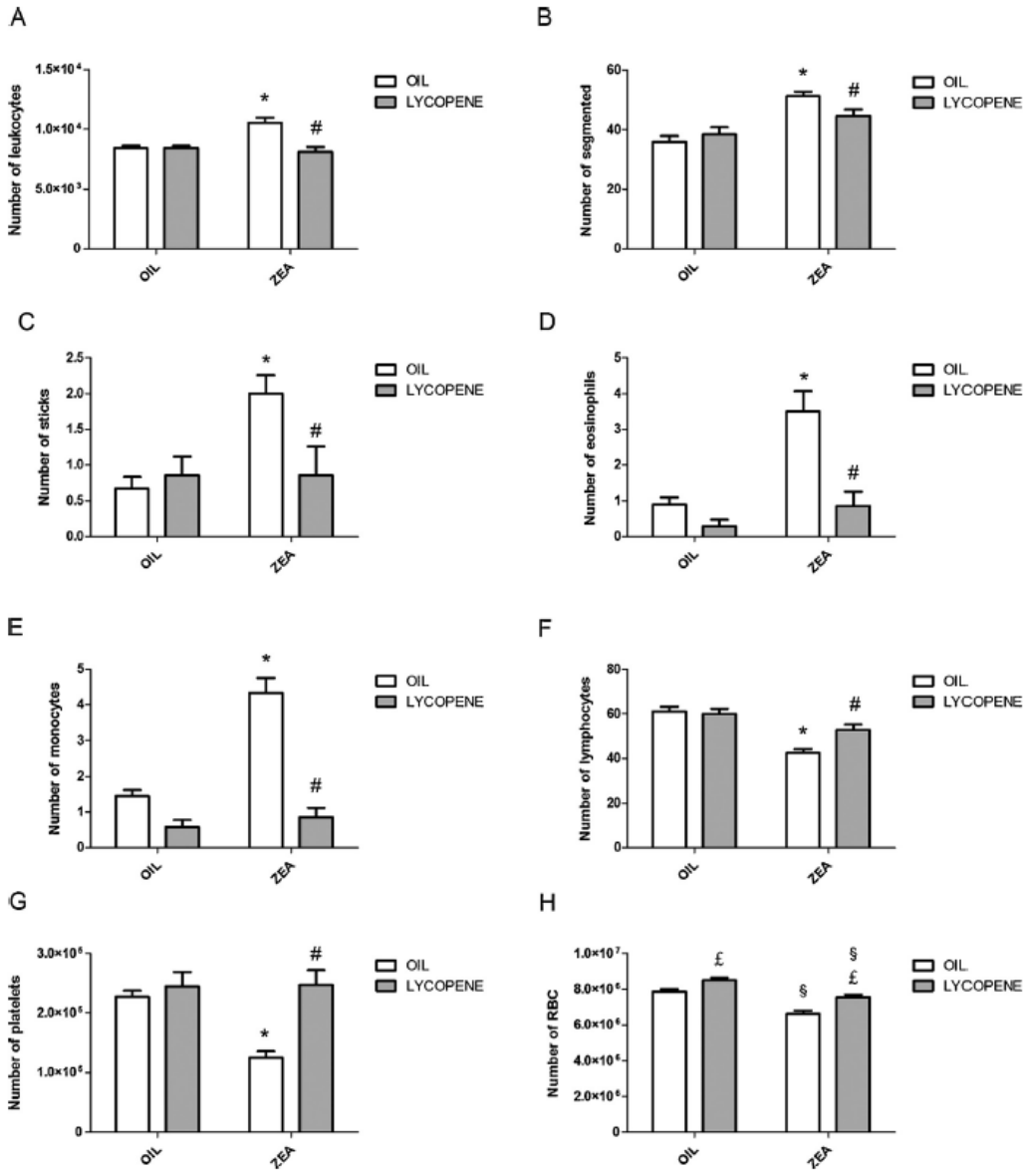

Fig. 2. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and lycopene (20 mg/kg, p.o.) on blood cell count. (A) Number of leukocytes ($F(1,25) = 16.28$, $P = 0.0005$), (B) segmented neutrophils ($F(1,25) = 4.77$, $P = 0.038$), (C) sticks ($F(1,25) = 5.75$, $P = 0.024$), (D) eosinophils ($F(1,25) = 8.92$, $P = 0.0062$), (E) monocytes ($F(1,25) = 24.79$, $P = 0.0001$), (F) lymphocytes ($F(1,25) = 6.21$, $P = 0.019$), (G) platelets ($F(1,25) = 7.70$, $P = 0.010$) and (H) red blood cells (RBC) (lycopene $F(1,25) = 22.31$, $P = 0.001$ and ZEA factors $F(1,25) = 43.04$, $P = 0.001$). Data are mean + S.E.M. for $n = 6$–9 animals in each group. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with olive oil group. #Indicates a significance difference ($P < 0.05$) compared with ZEA olive oil group. £Indicates a significance difference ($P < 0.05$) between lycopene and the respective vehicle-treated controls. §Indicates a significance difference ($P < 0.05$) between ZEA and the respective vehicle-treated controls.

the supernatant fraction (20–60 μl) was added to a medium containing glycine buffer (50 mM; pH 10.5) and epinephrine (1 mM). Reaction was started by adding epinephrine to the medium, and the reaction was spectrophotometrically followed at 480 nm for 300 s at 30 °C. One unit (U) of SOD was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine auto-oxidation by 50%, and SOD activity was expressed as U/mg protein.

2.5.3. Catalase (CAT) activity

CAT activity was determined in liver, kidney and testes, according to the method proposed by Aebi (1984). Briefly, the reaction medium consisted of 30 mM hydrogen peroxide in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). The reaction was spectrophotometrically followed at 240 nm for 120 s at 37 °C. CAT specific activity was expressed as first-order rate constant k corrected per

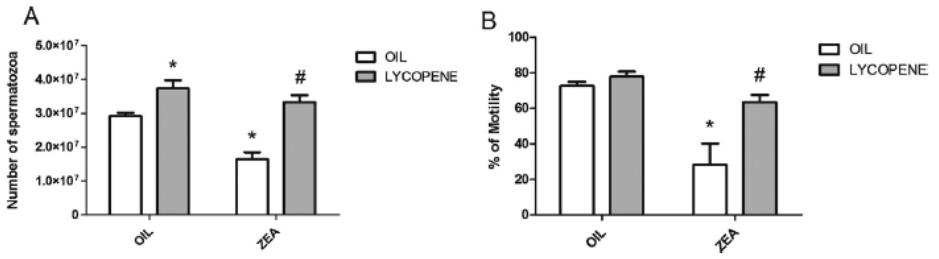

Fig. 3. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and lycopene (20 mg/kg, p.o.) on (A) number of spermatozoa in epididymis A: ($F(1,25) = 5.13$, $P = 0.03$) and (B) percentage of motile spermatozoa ($F(1,25) = 7.18$, $P = 0.012$). Data are mean + S.E.M. for $n = 6$–9 animals in each group. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with olive oil group. # Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ZEA olive oil group.

mg of protein. Appropriate controls for non-enzymatic decomposition of hydrogen peroxide were included in the assays.

2.6. Histopathologic examination

Testes were fixed in 10% formalin, dehydrated in ethanol, cleared in xylol and embedded in paraffin. After microtome sectioning at 4 μm, slices were stained with hematoxylin and eosin. Light microscopy was used for the evaluations, according to the method described previously by Brandão et al. (2009). The structural integrity of the testis, seminiferous tubules and interstitial tissues were evaluated, as well as morphology of spermatogonia, spermatocytes, spermatids and mature spermatozoa.

2.7. Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin (1 mg/ml) as standard.

2.8. Statistical analysis

Data were analyzed by two-way ANOVA and *post hoc* analyses were carried out by the Newman–Keuls test. When appropriate, data were transformed ($Y = \text{Log}(Y)$) to meet ANOVA requirements. A probability of $P < 0.05$ was considered significant, and all data are reported as mean and S.E.M.

3. Results

3.1. Hematological parameters

Treatment with lycopene for ten days did not change significantly blood parameters (leukocytes, segmented neutrophils, sticks, eosinophils, monocytes, lymphocytes and platelets number) (Fig. 2). On the other hand, a hematotoxic effect of ZEA and the protective effect of lycopene were evident after 48 h of exposure to a single dose of the mycotoxin. Statistical analysis revealed that ZEA significantly increased the number of leukocytes (Fig. 2A), segmented neutrophils (Fig. 2B), sticks (Fig. 2C), eosinophils (Fig. 2D) and monocytes (Fig. 2E). In addition, ZEA decreased the number of lymphocytes (Fig. 2F) and platelets (Fig. 2G). Interestingly, lycopene was able to prevent the changes in the number of all blood cells analyzed. ZEA and/or lycopene treatments did not change the count of basophils (data not shown).

Treatment with ZEA alone caused a significant decrease in RBCs (Fig. 2H). Mice treated with lycopene for ten days prior to ZEA exposure exhibited prevention in this parameter.

3.2. Reproductive parameters

Fig. 3 depicts the effects of ZEA and lycopene on reproductive parameters in male mice. Acute administration of ZEA significantly reduced the number (Fig. 3A) and motility of living spermatozoa

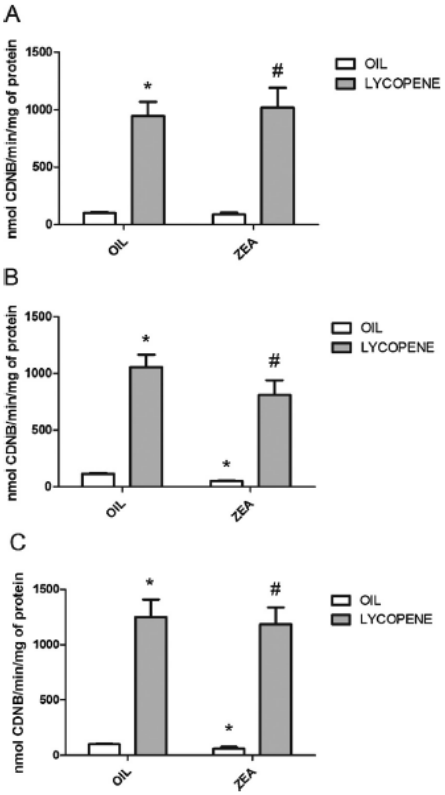

Fig. 4. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/kg, p.o.) on GST activity in (A) liver ($F(1,25) = 0.40$, $P = 0.530$), (B) kidney ($F(1,25) = 5.17$, $P = 0.031$) and (C) testes ($F(1,24) = 3.97$, $P = 0.05$). Data are mean + S.E.M. for $n = 5$–9 animals in each group. CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene). *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with olive oil group. # Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with ZEA olive oil group.

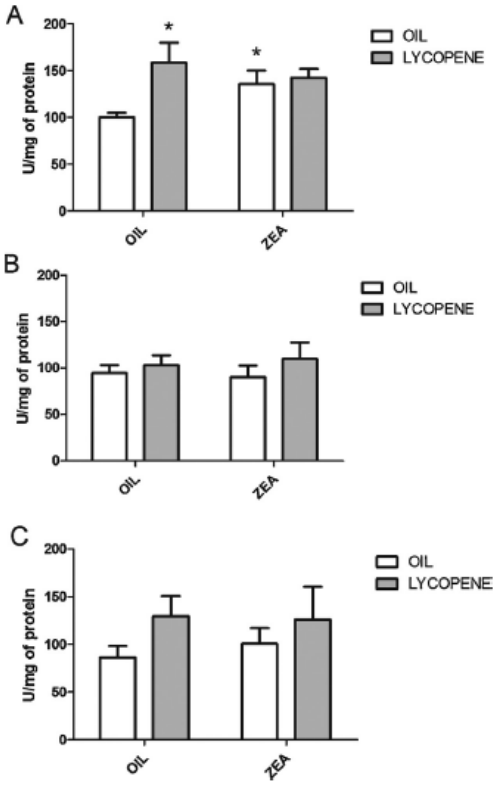

Fig. 5. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/kg, p.o.) on SOD activity in (A) liver ($F(1,25) = 4.29$, $P = 0.048$), (B) kidney ($F(1,25) = 0.028$, $P = 0.8683$) and (C) testes ($F(1,23) = 0.609$, $P = 0.4431$). Data are mean + S.E.M. for $n = 5$–8 animals in each group. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with olive oil group.

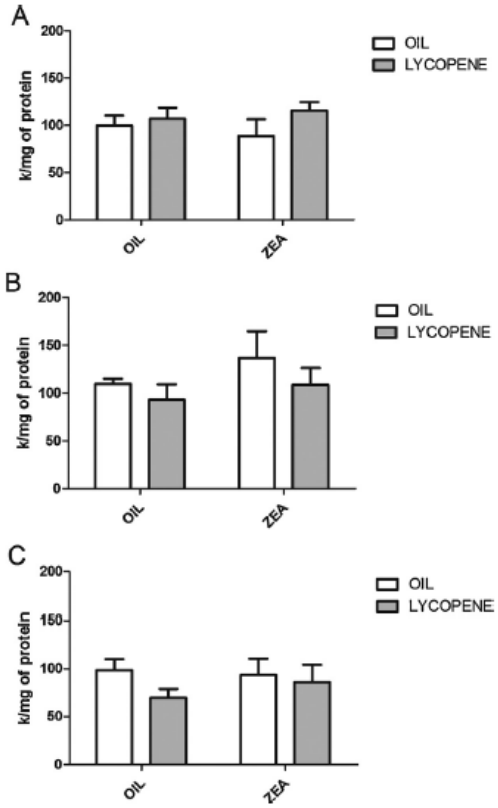

Fig. 6. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and Lycopene (20 mg/kg, p.o.) on CAT activity in (A) liver ($F(1,25) = 1.17$, $P = 0.2898$), (B) kidney ($F(1,25) = 0.0044$, $P = 0.9476$) and (C) testes ($F(1,24) = 0.4503$, $P = 0.5086$). Data are mean + S.E.M. for $n = 5$–9 animals in each group.

(Fig. 3B). Interestingly, lycopene increased sperm count *per se*, but did not affect motility of living spermatozoa. In addition, lycopene was able to prevent the deleterious effects of ZEA on sperm count and motility.

3.3. Antioxidant enzymes

Statistical analyses revealed that ZEA reduced GST activity in kidneys and testes (Fig. 4), and increased SOD activity in liver (Fig. 5). On the other hand, lycopene increased GST activity in all tissues, and prevented the ZEA-induced decrease in GST activity. Furthermore, lycopene increased hepatic SOD activity *per se*. CAT activity was not altered in any of the tissues evaluated (Fig. 6).

3.4. Histopathological analysis

Histopathological analysis of control and lycopene-treated animals showed germ cells in the seminiferous tubules and interstitial space of normal aspect (Fig. 7A–D). In ZEA-treated animals we detected hypercellularity in seminiferous tubules and also germ cells in different stages presenting pyknotic nuclei and eosinophilic cytoplasm. In addition, reduced intercellular connections typical of tissue injury were found (Fig. 7E and F). Importantly, lycopene prevented the testicular histopathological changes elicited by ZEA in spermatogonia, spermatocytes and spermatids (Fig. 7G and H).

4. Discussion

ZEA is a fusariotoxin occurs worldwide in cereals, animal food and forages (Placinta et al., 1999; Zinedine et al., 2007), and adversely affects reproduction (Creppy, 2002). In addition, ZEA is also associated with several human diseases of unknown etiology (Placinta et al., 1999). ZEA is a common contaminant of food (Abid-Essefi et al., 2011), and therefore studying the protective potential of natural compounds toward ZEA toxicity becomes important. Several experimental studies have evidenced that plant-based diets, in particular those rich in vegetables and fruits, provide a great amount of antioxidant phytochemicals, such as vitamins C and E, glutathione, flavonoids and vegetable pigments such as lycopene. Accordingly, they offer protection against oxidative cellular damage and consequently have been recognized as valuable sources of nutraceuticals (Dimitrios, 2006). In this context, the present study aimed to evaluate the protective effect of lycopene on hematological, reproductive, oxidative and histopathological deleterious effects induced by the mycotoxin ZEA in mice.

We showed that acute ZEA administration caused deleterious hematologic effects (Fig. 2) and strongly reduced the number and motility of spermatozoa (Fig. 3) in male Swiss albino mice. The role of oxidative stress in the toxic effects of ZEA was also investigated. Interestingly, this mycotoxin decreased GST activity in kidneys and testes (Fig. 4) and increased SOD activity in liver (Fig. 5). Histopathological analysis revealed toxic testicular effects induced

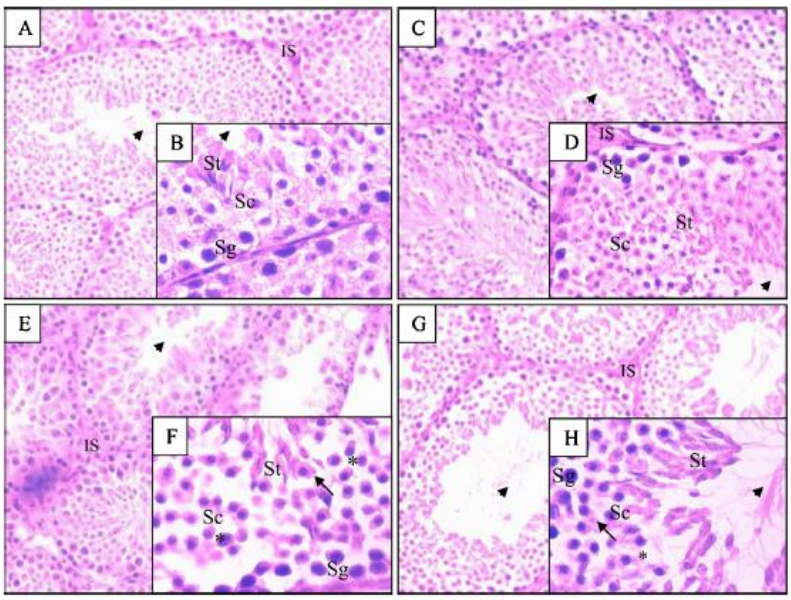

Fig. 7. Representative photomicrographs of hematoxylin-eosin stained sections from testis of mice ($n = 4$ in each group) treated with (A–B) olive oil only, (C–D) lycopene plus olive oil, (E–F) olive oil plus ZEA and (G–H) lycopene plus ZEA. Animals that received olive oil or lycopene but not ZEA the germ cells in the seminiferous tubules as well as the interstitial space appear with normal aspect. Note the presence of mature spermatogonia, spermatocyte and spermatids. In contrast, animals treated with ZEA and olive oil display hypercellularity in the seminiferous tubules and germ cells containing pyknotic nuclei (*) and eosinophilic cytoplasm (arrow). Also, intercellular connections were reduced. G and H represent lycopene + ZEA-treated animal showed slight organization in germ cells with spermatogonia, spermatocytes and spermatids. Note the immature spermatids and spermatocytes with eosinophilic (arrow). I, interstitial space; tubular lumen (arrowhead); Sg, spermatogonia; Sc, spermatocyte; St, spermatids. Magnifications are 10× (in A, C, E and G) or 40× (in B, D, F and H), respectively.

by this mycotoxin (Fig. 7). Importantly, treatment with lycopene for ten days prior to ZEA exposure prevented the toxic effects of ZEA on blood cells number, number and motility of spermatozoa and histopathological damage. In addition, lycopene treatment prevented the ZEA-induced decrease in renal and testicular GST activity, but did not alter hepatic SOD activity.

Lycopene, a naturally occurring carotenoid, has received particular attention in recent years because of its high antioxidant activity and free radical scavenging capacity (Cohen, 2002; Atessahin et al., 2006). For instance, lycopene is well known as highly efficient scavenger of singlet oxygen (O_2) and other reactive species. During O_2 quenching, energy is transferred from O_2 to the lycopene molecule, converting it to the energy-rich triplet state. Thus, lycopene may protect *in vivo* against oxidation of lipids, proteins, and DNA (Gupta and Kumar, 2002; Stahl and Sies, 2003). Lycopene has been shown to have the highest antioxidant activity among the carotenoids regarding cell protection against hydrogen peroxide and nitrogen dioxide radical components (Bose and Agrawal, 2007). In addition, lycopene has been reported to attenuate oxidative stress and exert anticancer effects both *in vitro* and *in vivo* (Cohen, 2002; Atessahin et al., 2006). Bose and Agrawal (2007) reported that lycopene elevated the concentrations of GSH, which plays a major role in maintaining high glutathione peroxidase and GST activities. Additionally, Kumar and Kumar (2009) showed that lycopene treatment (2.5, 5 and 10 mg/kg) significantly improved memory and restored GST activity in the striatum, hippocampus and cortex of the brain after 3-NP model of Huntington's disease.

Several antioxidant preparations have been examined for screening of compounds capable of crossing the blood testes barrier and protecting the germinal epithelium and Leydig cells from oxidative stress (Aitken and Roman, 2008). For instance, Turk et al. (2008) showed that ellagic acid, a phenolic antioxidant compound, ameliorated the cisplatin-induced reductions in weights of testes, epididymis, seminal vesicles, and prostate along with epididymal sperm concentration and motility. In addition, it has been reported that the therapeutic antioxidant effect of lycopene (Hekimoglu et al., 2009) and ellagic acid (Turk et al., 2011) on germ cells could serve as promising intervention to oxidative stress-induced infertility problems. In the present study, lycopene prevented the testicular histopathological damage caused by ZEA, as well as the harmful effects of this mycotoxin on sperm count and motility. To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the antioxidant activity of lycopene against testicular ZEA toxicity. To some extend, our present results agree with previous studies on the protective effect of lycopene. For instance, Tang et al. (2007) demonstrated that lycopene prevented the oxidative damage to DNA as well as the metabolic activation of aflatoxin B1 in F344 rats. Moreover, Leal et al. (1999) showed that lycopene prevented the occurrence of oxidative stress in broiler chicks exposed to T-2 toxin.

In conclusion, in the present study we showed that ZEA treatment markedly impaired testicular function as well as caused oxidative stress in Swiss albino mice. Importantly, treatment with lycopene prevented such toxic effects. Our results also indicate that lycopene could represent a preventive approach to minimize the deleterious effects associated with ZEA exposure.

Acknowledgements

Research supported by FAPERGS (grants # 10/0685-8, # 11/1630-1 and # 1879-25.51/13-6) and PqG 2013. Ana Flávia Furian, Mauro Schneider Oliveira, Michele Rechia Fighera, Luiz Fernando Freire Royes and Lucian Del Fabbro are the recipients of

CNPq fellowships. Carlos Borges Filho is the recipient of FAPERGS fellowships.

References

Abid-Essefi S, Zaied C, Bouaziz C, Salem IB, Kaderi R, Bacha H. Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress. Exp Toxicol Pathol 2011;64:689–95.

Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 1984;105:121–6.

Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. Oxid Med Cell Longev 2008;1:15–24.

Atessahin A, Karahan I, Turk G, Gur S, Yilmaz S, Ceribasi AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. Reprod Toxicol 2006;21: 42–7.

Atessahin A, Yilmaz S, Karahan I, Ceribasi AO, Karaoglu A. Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. Toxicology 2005;212:116–23.

Boeira SP, Filho CB, Del'Fabbro L, Royes LF, Jesse CR, Oliveira MS, Furian AF. Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. Toxicon 2012;60: 358–66.

Bose KS, Agrawal BK. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. Singapore Med J 2007;48:415–20.

Boyd PA, Wittliff JL. Mechanism of *Fusarium* mycotoxin action in mammary gland. J Toxicol Environ Health A 1978;4:1–8.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54.

Brandão R, Santos FW, Oliveira R, Roman SS, Nogueira CW. Involvement of non-enzymatic antioxidant defenses in the protective effect of diphenyl diselenide on testicular damage induced by cadmium in mice. J Trace Elem Med Biol 2009;23:324–33.

Cohen LA. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. Exp Biol Med (Maywood) 2002;227:864–8.

Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol Lett 2002;127:19–28.

Dahan K, Fennal M, Kumar NB. Lycopene in the prevention of prostate cancer. J Soc Integr Oncol 2008;6:29–36.

Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. Trends Food Sci Technol 2006;17:505–12.

Failace RR, Fernandes FB, Hemograma: Manual de Interpretação. 5ª ed. Artmed; 2009.

Freund M, Carol B. Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human semen. J Reprod Fertil 1964;8:149–55.

Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. J Natl Cancer Inst 1999;91:317–31.

Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC. A prospective study of tomato products, lycopene, and prostate cancer risk. J Natl Cancer Inst 2002;94:391–8.

Greenman DL, Mehta RG, Wittliff JL. Nuclear interaction of *Fusarium* mycotoxins with estradiol binding sites in the mouse uterus. J Toxicol Environ Health A 1979;5:593–8.

Gromadzka K, Waskiewicz A, Chelkowski J, Golinski P. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. World Mycotoxin J 2008;1:209–20.

Gupta NP, Kumar R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility – a preliminary report. Int Urol Nephrol 2002;34:369–72.

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J Biol Chem 1974;249:7130–9.

Hassen W, Ayed-Boussema I, Oscoz AA, Lopez Ade C, Bacha H. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, gluthatione depletion and stress proteins induction. Toxicology 2007;232:294–302.

Hekimoglu A, Kurcer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Atessahin A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. Tohoku J Exp Med 2009;218:141–7.

Kouadio JH, Mobio TA, Baudrimont I, Moukha S, Dano SD, Creppy EE. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. Toxicology 2005;213:56–65.

Kumar P, Kumar A. Effect of lycopene and epigallocatechin-3-gallate against 3-nitropropionic acid induced cognitive dysfunction and glutathione depletion in rat: a novel nitric oxide mechanism. Food Chem Toxicol 2009;47:2522–30.

Leal M, Shimada A, Rur'z F, Mejr'a GE. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. Toxicol Lett 1999;109:1–10.

Minervini F, Dell'Aquila ME. Zearalenone and reproductive function in farm animals. Int J Mol Sci 2008;9:2570–84.

Misra HP, Fridovich I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. J Biol Chem 1972;247:6960–2.

Othmen ZO, Golli EE, Abid-Essefi S, Bacha H. Cytotoxicity effects induced by zearalenone metabolites, alpha zearalenol and beta zearalenol, on cultured vero cells. Toxicology 2008;252:72–7.

Ozten-Kandas N, Bosland MC. Chemoprevention of prostate cancer: natural compounds, antiandrogens, and antioxidants - In vivo evidence. J Carcinog 2011;10:27.

Placinta CM, D'Mello JPF, Mac Donald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. Anim Feed Sci Technol 1999;78:21–37.

Rao AV. Lycopene, tomatoes, and the prevention of coronary heart disease. Exp Biol Med (Maywood) 2002;227:908–13.

Schollenberger M, Muller HM, Rufle M, Suchy S, Plank S, Drochner W. Natural occurrence of 16 fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany. Mycopathologia 2006;161:43–52.

Schwarz S, Obermuller-Jevic UC, Hellmis E, Koch W, Jacobi G, Biesalski HK. Lycopene inhibits disease progression in patients with benign prostate hyperplasia. J Nutr 2008;138:49–53.

Shami NJIE, Moreira EAM. Licopeno como agente antioxidante. Rev Nutr 2004;17:227–36.

Sonmez M, Turk G, Ceribasi AO, Sakin F, Atessahin A. Attenuating effect of lycopene and ellagic acid on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced spermiotoxicity and testicular apoptosis. Drug Chem Toxicol 2011;34:347–56.

Stahl W, Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. Mol Aspects Med 2003;24:345–51.

Szkudelska K, Szkudelski T, Nogowski L. Daidzein, coumestrol and zearalenone affect lipogenesis and lipolysis in rat adipocytes. Phytomedicine 2002;9:338–45.

Tang L, Guan H, Ding X, Wang J. Modulation of aflatoxin toxicity and biomarkers by lycopene in F344 rats. Toxicol Appl Pharmacol 2007;219:10–7.

Tiemann U, Danicke S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. Food Addit Contam 2007;24:306–14.

Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Ceribasi AO, Yuce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. Fertil Steril 2008;89:1474–81.

Turk G, Ceribasi AO, Sahna E, Atessahin A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. Phytomedicine 2011;18:356–61.

Voutilainen S, Nurmi T, Mursu J, Rissanen TH. Carotenoids and cardiovascular health. Am J Clin Nutr 2006;83:1265–71.

Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Food Chem Toxicol 2007;45:1–18.

ARTIGO 2

Lycopene protects against acute zearalenone-induced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice

Silvana Peterini Boeira[a,b], Vinícius Funck[a], Carlos Borges Filho[b,c], Lucian Del'Fabbro[b,c], Marcelo Gomes de Gomes[b,c], Franciele Donato[b,c], Luiz Fernando Freire Royes[a], Mauro Schneider Oliveira[a], Cristiano Ricardo Jesse[b,c], Ana Flávia Furian[a,d]*

(Artigo submetido ao periódico Chemico Biological Interactions)

[a] Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

[b] Laboratório de avaliações farmacológicas e toxicológicas aplicadas às moléculas bioativas (Laftambio Pampa), Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, 97650-000 Itaqui, RS, Brasil

[c] Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, 97500-970, Uruguaiana, RS, Brasil

[d] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

Elsevier Editorial System(tm) for Chemico-Biological Interactions
Manuscript Draft

Manuscript Number: CHEMBIOINT-D-14-00500

Title: Lycopene protects against acute zearalenone-induced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice

Article Type: Research Paper

Keywords: mycotoxins; testes; reproductive system; carotenoid; glutathione

Corresponding Author: Prof. Ana Flávia Furian, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Santa Maria

First Author: Silvana Peterini Boeira, MSc

Order of Authors: Silvana Peterini Boeira, MSc; Vinícius Rafael Funck, MSc; Carlos Borges Filho, MSc; Lucian Del'Fabbro; Marcelo Gomes de Gomes; Franciele Donato, MSc; Luiz Fernando Freire Royes, PhD; Mauro Schneider Oliveira, PhD; Cristiano Ricardo Jesse, PhD; Ana Flávia Furian, PhD

Abstract: Male mice received lycopene for ten days before a single oral administration of ZEA and 48 h thereafter testes and blood were collected. Mice treated with lycopene/ZEA exhibited amelioration of the hematological changes. Lycopene prevented the reduction in the number and motility of spermatozoa and testosterone levels, indicating a protective effect in the testicular damage induced by ZEA. Lycopene was also effective in protecting against the decrease in glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione redutase and δ-aminolevulic acid dehydratase activities caused by ZEA in the testes. Exposure of animals to ZEA induced modification of antioxidant and inflammatory status with reduction of glutathione (GSH) levels and increase of the oxidized glutathione, interleukins 1β, 2, 6 and tumor necrosis factor-α levels. Lycopene prevented ZEA-induced changes in GSH levels and inhibited the processes of inflammation, reducing the damage induced by ZEA. Altogether, our results indicate lycopene was able to prevent ZEA-induced damages in the mice.

Lycopene protects against acute zearalenone-induced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice

Silvana Peterini Boeira[a,b], Vinícius Funck[a], Carlos Borges Filho[b,c], Lucian Del'Fabbro[b,c], Marcelo Gomes de Gomes[b,c], Franciele Donato[b,c], Luiz Fernando Freire Royes[a], Mauro Schneider Oliveira[a], Cristiano Ricardo Jesse[b,c], Ana Flávia Furian[a,d]*

[a] Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

[b] Laboratório de avaliações farmacológicas e toxicológicas aplicadas às moléculas bioativas (Laftambio Pampa), Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, 97650-000 Itaqui, RS, Brasil

[c] Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, 97500-970, Uruguaiana, RS, Brasil

[d] Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

*Corresponding author:

Prof[a]. Dr[a]. Ana Flávia Furian; Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 43, Sala 4217; 97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL, PHONE: +55 55 3220 8254, e-mail: furian.anaflavia@gmail.com

Abstract

Male mice received lycopene for ten days before a single oral administration of ZEA. After 48 h testes and blood were collected. Mice treated with lycopene/ZEA exhibited amelioration of the hematological changes. Lycopene prevented the reduction in the number and motility of spermatozoa and testosterone levels, indicating a protective effect in the testicular damage induced by ZEA. Lycopene was also effective in protecting against the decrease in glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione redutase and δ-aminolevulic acid dehydratase activities caused by ZEA in the testes. Exposure of animals to ZEA induced modification of antioxidant and inflammatory status with reduction of glutathione (GSH) levels and increase of the oxidized glutathione, interleukins 1β, 2, 6 and tumor necrosis factor-α levels. Lycopene prevented ZEA-induced changes in GSH levels and inhibited the processes of inflammation, reducing the damage induced by ZEA. Altogether, our results indicate that lycopene was able to prevent ZEA-induced damage in the mice.

Keywords: mycotoxins; testes, reproductive system; carotenoid; glutathione.

DISCUSSÃO

A zearalenona (ZEA) é uma micotoxina estrogênica e termoestável, desenvolvendo-se nos mais variados tipos de grãos dependendo de determinadas condições de temperatura e umidade. Já foram descritos na literatura os seus diversos efeitos nocivos tanto em humanos quanto em animais (ANTONISSEN et al., 2014; MARIN et al., 2013), no entanto, carecem estudos que abordem alternativas terapêuticas para os diversos tipos de efeitos tóxicos induzidos por esta micotoxina. Nesse sentido, estudos com compostos antioxidantes capazes de atenuar ou proteger os efeitos tóxicos de determinadas micotoxinas têm sido realizados. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ação protetora do licopeno frente aos efeitos tóxicos induzidos pela micotoxina zearalenona em camundongos machos.

Com base nos nossos resultados, é possível compreender os efeitos deletérios da intoxicação aguda com a ZEA no sistema reprodutivo de camundongos Swiss machos através da significativa redução do número de espermatozóides bem como da motilidade espermática e nível de testosterona plasmática. O sistema hematológico representado pela série branca e vermelha também foi prejudicado pela ação hematotóxica da ZEA. A determinação de parâmetros enzimáticos e não-enzimáticos do estresse oxidativo também apresentou relação com a toxicidade induzida pela ZEA. A exposição aguda à micotoxina levou a uma diminuição da atividade das enzimas GST (glutationa-S-transferase) nos rins e testículos, GR (glutationa redutase) e δ-ALA-D (ácido Delta-aminolevulínico desidratase) nos testículos. Os níveis de GSH (glutationa reduzida) e da relação GSH/GSSG foram diminuídos pela ação da ZEA enquanto que os níveis de GSSG (glutationa oxidada) foram aumentados pela ação da mesma. Como uma micotoxina imunotóxica, a ZEA aumentou os parâmetros inflamatórios IL-2 (interleucina-2), IL-6 (interleucina-6), IL-1β (interleucina-1β) e TNF-α (fator de necrose tumoral-α). De maneira preventiva o pré-tratamento com licopeno foi capaz de atenuar os efeitos tóxicos da ZEA em praticamente todos os parâmetros analisados.

A hematoxicidade da ZEA é pouco relatada na literatura (ABBÈS et al., 2006; BOEIRA et al., 2012; MAAROUFI et al., 1996; SALAH-ABBES et al., 2008a) e por isso não há um mecanismo definido para explicar a toxicidade desta micotoxina nas células sanguíneas. Em nosso trabalho a ZEA foi capaz de aumentar o número de leucócitos totais indicando uma possível resposta inflamatória e por sua vez alterações na medula óssea e sistema imunológico. Observou-se ainda aumento de hematócrito e hemoglobina bem como uma diminuição do número de hemáceas predizendo que a ZEA foi capaz de induzir hemólise e levar os animais ao quadro de anemia. Quanto à diminuição do número de linfócitos a mesma reforça a capacidade imunossupressora desta micotoxina e corrobora com os resultados de outros estudos (CHATTOPADHYAY et al., 2013; MEKKAWY et al., 2011). Verificou-se que semelhante ao estrogênio, a ZEA pode modular grande parte das respostas imunitárias e prejudicar órgãos linfóides, resultando na atrofia do timo e assim diminuição na produção de linfócitos (HUEZA et al., 2014). A diminuição do número de plaquetas pode estar relacionada com alterações na coagulação sanguínea (MAAROUFI et al.,1996). O tratamento com licopeno foi capaz de impedir os efeitos da ZEA nos parâmetros hematológicos com possível envolvimento de propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias deste carotenóide.

A δ-ALA-D é uma enzima envolvida na síntese do heme, o principal constituinte da hemogobina. A diminuição da atividade desta enzima pode provocar distúrbios na síntese da hemoglobina, provocando quadros de anemia. Sua inibição pode ser induzida por diversos fatores, incluindo metais como chumbo e alumínio ou ainda por outras substâncias que possam levar a sua oxidação, pois ela possui grupamentos sulfidrílicos ativos (-SH) altamente sensíveis a eventos pró-oxidantes (GABRIEL et al., 2005). Em nosso trabalho verificamos que a atividade desta enzima foi reduzida pela ação tóxica da ZEA e completamente prevenida pelo antioxidante licopeno. Esse foi o primeiro trabalho a avaliar a atividade desta enzima frente aos efeitos de uma das mais importantes micotoxinas toxigênicas, a ZEA. Além disso, postula-se que parte das alterações hematológicas induzidas pela ZEA devem-se a inibição da δ-ALA-D e que esta inibição pode estar relacionada ao estresse oxidativo

induzido pela micotoxina e a maior oxidação desta enzima. A inibição da δ-ALA-D pode levar ao acúmulo do seu substrato, o ácido levulínico, levando ao aumento do estresse oxidativo, já que este ácido é um pró-oxidante (ZANINI et al., 2014). Assim, o efeito do licopeno na proteção da inibição da δ-ALA-D no tecido testicular em camundongos é devido às suas propriedades antioxidantes.

Muitos estudos mostram a participação do estresse oxidativo nos efeitos tóxicos induzidos pelas micotoxinas, e atribuem a este fato a hepatotoxicidade característica induzida por elas. Sugere-se que os efeitos tóxicos são mediados pelo aumento da produção de espécies reativas como o ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio durante o metabolismo hepático da micotoxina (AITKEN et al., 2008). O estresse oxidativo nos testículos é um dos maiores fatores que induzem apoptose de células germinativas, apesar deste órgão possuir concentrações relativamente altas de antioxidantes, como a glutationa na forma reduzida (GSH), ácido ascórbico e vitamina E (SANOCKA; KURPISZ, 2004). Estas substâncias protegem as células germinativas contra danos ao DNA e desempenham funções importantes na espermatogênese (KASAHARA et al, 2002). Com base nos resultados de Hassen et al., (2007), a ZEA parece produzir muitos efeitos sobre o sistema oxidante como a diminuição significativa do nível de GSH.

O sistema de glutationa desempenha um papel crítico em diversos processos biológicos, incluindo a manutenção de grupos sulfidril em proteínas de membrana, a desintoxicação de drogas em reações envolvendo a glutationa-S-transferase, o reparo de moléculas danificadas e a detoxicação nos órgãos reprodutores masculinos prejudicados por EROS (FUJII et al., 2003). A glutationa é importante na regulação do estado redox celular, e um declínio em seu nível celular tem sido considerado como indicativo do estresse oxidativo. Além disso, o sistema glutationa é possivelmente desequilibrado pela ZEA que resulta em uma diminuição na contagem de espermatozóides (BOEIRA et al., 2012; SALAH-ABBE` S et al., 2009). Sugere-se que a ZEA atue causando um desequílibrio oxidativo levando ao aumento do estresse oxidativo além de alterações hormonais e inflamatórias. Em nosso trabalho, a exposição aguda à ZEA provocou diminuição do número de espermatozóides, motilidade

espermática e níveis de testosterona. A regulação do estado redox, dos níveis hormonais e inflamatórios no tecido testicular torna-se de extrema relevância a fim de evitar a infertilidade e alterações espermáticas (LIU et al., 2014). Além disso, a ZEA por ser uma micotoxina estrogênica parece atuar diretamente nos receptores estrogênicos masculinos e alterar a produção de testosterona e assim, o ambiente endócrino à nível testicular torna-se comprometido impactando no estatus antioxidante deste órgão (KUIPER-GOODMAN et al., 1987; LIU et al., 2014). As alterações na contagem e motilidade espermática bem como nos níveis de testosterona foram completamente prevenidas pelo tratamento com licopeno, demonstrando o seu efeito protetor e modulador do estresse oxidativo bem como de parâmetros reprodutivos e hormonais.

A glutationa faz parte de um ciclo catalítico na qual algumas enzimas apresentam importante relevância no seu completo funcionamento. A glutationa existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG), detoxificando substâncias por três caminhos: reação de conjugação catalisada pela GST, reação de conjugação através de simples reação química com o metabólito reativo e a via de reação catalisada pela enzima GPX (TIMBRELL, 2000). A GPX catalisa a redução de H_2O_2 e peróxidos orgânicos a seus alcoóis correspondentes às custas da conversão de GSH em GSSG, dependendo essencialmente da presença de selênio. Outra enzima que age conjuntamente com a GPX é GR. Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da glutationa à sua forma reduzida (GSH) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutationa (AITKEN et al., 2008). Em nosso estudo, a ZEA induziu toxicidade testicular através do desequilíbrio do sistema glutationa caracterizado pela diminuição das atividades das enzimas GST e GR além da diminuição dos níveis de GSH, assim como da relação GSH/GSSG. Em relação à GPX, apesar de outros estudos demonstrarem que a ZEA reduz a atividade desta enzima, no nosso estudo não observamos resultados significativos, e sim uma tendência quanto à diminuição da atividade enzimática (SALAH-ABBE` S et al., 2009; STADNIK et al., 2010).

O fato de o testículo ser um órgão rico em ácidos graxos insaturados e assim, ser suscetível ao estresse oxidativo faz do sistema glutationa um dos principais mecanismos de ação da ZEA. Nesse sentido, sugerimos que a ZEA atue em células germinais masculinas, através da capacidade de induzir o estresse oxidativo causando uma redução da atividade da enzima antioxidante GST (BOEIRA et al., 2012). A GST é uma família de enzimas intracelulares divididas em cinco grupos principais com suas respectivas subunidades: Alpha (A1, A2, A3 e A4), Pi (P1), Mu (M1, M2, M3, M4 e M5), Theta (T1 e T2), e Zeta (BOARD et al., 1997; LIZARD-NACOL et al., 1999). Essa família de enzimas, localizada no citosol celular, impede a ação de substâncias sobre as células, evitando danos ao seu DNA (MANNERVIK, 1985). Tais enzimas catalisam a conjugação de diversos compostos eletrofílicos à glutationa, promovendo a formação, na maioria das vezes, de metabólitos menos reativos e mais solúveis em água, o que faz com que sejam mais prontamente excretados pela urina (ZHENG et al., 2002). Sabe-se atualmente que o sistema GST também exerce papel importante no metabolismo dos estrogênios (PARK et al., 2003). Diante disso, têm sido demonstrado que a GST tem um papel relevante de proteção durante a espermatogênese (CASTELLON, 1999) e que o gene Mu-1 (GSTM1) é uma isoenzima crítica na prevenção do estresse oxidativo em espermatozóides (CHEN et al., 2002). Além disso, uma diminuição na contagem e motilidade de espermatozóides, além do aumento no número de espermatozóides mortos foi observado em seres humanos sem o gene GSTM1 (VANI, 2010), sugerindo um papel ainda mais crítico para a atividade da GST nos casos de infertilidade e oligozoospermia.

Diante da relevante toxicidade da ZEA na atividade enzimática da GST, nosso trabalho avaliou a expressão desta enzima nos testículos. Esse foi o primeiro trabalho a verificar a atividade e a expressão desta enzima a nível testicular, no entanto, a expressão da GST não foi modificada pela ação da ZEA. Além disso, a exposição aguda à ZEA provocou danos ao tecido testicular, levando ao aparecimento de núcleos picnóticos, citoplasma eosinofílico e redução das conexões intercelulares típicas de dano tecidual predizendo que a ZEA induziu um processo inflamatório. Todos os dados ao nível de tecido testicular mostrados nesse trabalho reafirmam o postulado que

a ZEA possui o sistema reprodutor como um de seus principais alvos (LI et al., 2014; MINERVINI; DELL'AQUILA, 2008; TIEMANN; DANICKE, 2007). Esta micotoxina reduz o sistema glutationa, aumentando o estresse oxidativo e ocasionando diminuição das reservas antioxidantes, da imunidade bem como o desenvolvimento de processos inflamatórios e da ocorrência das várias alterações reprodutivas nos animais. Em contraste, os nossos resultados mostraram que o tratamento com licopeno minimizou os efeitos deletérios da ZEA em vários parâmetros analisados, tais como o aumento da atividade das enzimas testiculares (GST, GPx e GR), testosterona e os níveis de GSH e da relação GSH/GSSG. Pode-se concluir que o licopeno atuou normalizando o sistema glutationa e suas enzimas relacionadas. A ação protetora deste carotenóide deve-se, em parte, a sua estrutura química, visto que a mesma é determinante das suas propriedades físicas, químicas e biológicas. Além disso, esse é o primeiro estudo que relaciona os efeitos antioxidantes do licopeno com a toxicidade reprodutiva da ZEA.

O licopeno é tido como o carotenóide que possui a maior capacidade seqüestrante do oxigênio singlete, pois além das 11 ligações duplas conjugadas possui duas ligações duplas não conjugadas, o que lhe oferece maior reatividade e ação antioxidante (ANGUELOVA; WARTHESEN, 2000; PRASAD; MISHRA, 2014). Assim, a fundamental atribuição protetora conferida ao licopeno está associada ao seu destacado poder de reação com o oxigênio singlete (MARTÍNEZ et al., 2014; RAO; AGARWAL, 2000). O licopeno é conhecido por ser o sequestrante mais eficiente do oxigênio singlete ($^1O_2$) e de outras espécies reativas. O oxigênio singlete é uma molécula extremamente reativa e é a forma mais reativa conhecida do oxigênio. Sua desativação por parte do licopeno envolve a transferência de energia do $^1O_2$ para o carotenóide, gerando O_2 no estado fundamental e o licopeno no estado tripleto excitado. A energia absorvida pelo licopeno é dissipada por vibrações e rotações e as interações destas com o meio circundante. O licopeno permanece intacto no final do processo, estando apto para novas desativações. Este é considerado o principal mecanismo de ação deste nutracêutico e explica os efeitos protetores *in vivo* contra as oxidações em lipídeos, proteínas e o DNA (GUPTA; KUMAR, 2002; STAHL; SIES, 2003). O licopeno possui uma das mais altas atividades

antioxidantes entre os carotenóides sendo capaz de proteger as células contra o radical peróxido de hidrogênio e radicais derivados do nitrogênio, como o dióxido de nitrogênio, além de ser capaz de aumentar os níveis de SOD, GPX e GST (BOSE; AGRAWAL, 2007; BOEIRA et al., 2014).

O licopeno além de suas várias propriedades benéficas já descritas na literatura tem sido demonstrado como um importante agente anti-inflamatório reduzindo a produção de citocinas pró- inflamatórias (PALOZZA et al., 2014). Além disso, o sistema imunológico é um alvo potencial para desreguladores endócrinos como a ZEA já que várias células do sistema imunitário possuem receptores estrogênicos (WANG et al., 2012). Nesse sentido, os resultados do nosso trabalho mostram que a toxicidade aguda da ZEA aumentou significativamente os parâmetros inflamatórios IL-1β, Il-2, IL-6 e TNF-α e que o licopeno foi capaz de prevenir e reduzir os mesmos parâmetros analisados. As citocinas são proteínas responsáveis pela comunicação intercelular no sistema imune. São reguladores centrais do crescimento e diferenciação de leucócitos, sendo produzidas por uma grande variedade de tipos celulares, tendo por alvo diferentes grupos de células e exibindo inúmeras atividades biológicas (KUNZ et al., 2011). Dentre as citocinas pró-inflamatórias, a IL-1β e o TNF-α atuam em conjunto como mediadores da resposta inflamatória aguda induzindo macrófagos e células endoteliais a produzirem quimiocinas importantes, como as interleucinas IL-2 e IL-6. Além disso, é sabido que o estresse oxidativo tem um importante papel no desenvolvimento de diferentes doenças inflamatórias caracterizadas pela alteração de vários marcadores imunológicos (MADEDDU et al., 2014).

Estudos têm demonstrado uma íntima relação entre as interleucinas pró-inflamatórias com o sistema reprodutor masculino (HABIBI et al., 2014). Uma vez que as interleucinas IL-1β, IL-2 e IL-6 já foram detectadas em macrófagos testiculares e células de Leydig acredita-se que as mesmas quando produzidas em níveis patológicos podem levar ao desenvolvimento de lesões teciduais bem como alterações inflamatórias capazes de danificar o funcionamento do aparelho reprodutor masculino (FIJAK et al., 2011). Ademais, o TNF-α parece estar envolvido na fisiopatologia testicular já que é expresso em células de Sertoli, espermátides, espermatócitos e macrófagos testiculares (PÉREZ et al.,

2013). É fato considerar que existe uma relevante ligação entre a indução do estresse oxidativo e as alterações reprodutivas e imunológicas provocadas pela toxicidade da ZEA. Sugere-se que esta micotoxina atue ligando-se a receptores estrogênicos induzindo o estresse oxidativo por aumentar os radicais livres com depleção das reservas antioxidantes (JIA et al., 2014). Assim, o animal acometido tem seu sistema imune afetado favorecendo o desenvolvimento de alterações inflamatórias do sistema reprodutor e células sanguíneas. Apesar dos nossos resultados terem mostrado um aumento dos parâmetros inflamatórios em função da imunotoxicidade da ZEA, outros trabalhos afirmam que o seu papel na inflamação não foi totalmente compreendido e que a mesma pode atuar tanto como indutora e supressora de citocinas pró-inflamatórias (MARIN et al., 2010, 2011; SALAH-ABBÈS et al., 2008b).

Além disso, a escolha do licopeno como antioxidante capaz de prevenir os danos deletérios da ZEA é um elemento inédito a se considerar neste trabalho, no entanto, as propriedades benéficas deste carotenóide já foram estudadas em outros trabalhos e por isso da escolha do mesmo, como possível alternativa aos efeitos nocivos da ZEA, sobretudo no sistema reprodutor masculino. Vários estudos no sistema reprodutor de camundongos machos têm demonstrado que o licopeno é capaz de reverter injúrias testiculares como diminuição da contagem de espermatozóides, motilidade espermática, anormalidades acrossômicas e alterações quanto ao peso de vesícula seminal e epidídimos (ATESSAHIN et al., 2006, 2010; HEMIMOGLU et al., 2009; SALEM et al., 2012; TURK et al., 2011). Além de um importante antioxidante, o licopeno atua como um relevante modulador hormonal. O licopeno é capaz de interferir na sinalização estrogênica mediando a proliferação celular na carcinogênese além de regular a produção de testosterona visto que os hormônios estrogênicos atuam como fatores de risco para alguns tipos de câncer (FORD et al., 2012; RAFI et al., 2013). A propriedade anti-inflamatória do licopeno também já foi relatada na literatura. Sabe-se que o licopeno é capaz de reduzir a proliferação e a migração de células inflamatórias como macrófagos e linfócitos assim como interleucinas pró-inflamatórias (BUYUKLU et al., 2014; HUANG et al., 2013).

Diante do exposto, podemos concluir que a ZEA induziu estresse oxidativo e teve o sistema reprodutor como seu principal alvo provocando alterações reprodutivas, oxidativas, inflamatórias, hematológicas e endócrinas. Acredita-se que o principal mecanismo da ação tóxica da ZEA esteja relacionado ao desequilibrio do sistema glutationa, e que a partir desta desregulação, há uma cascata de eventos nos demais tecidos alvos. O licopeno, através de suas propriedades, atua como preventivo nos eventos tóxicos induzidos pela ZEA, equilibrando o sistema glutationa e normalizando as demais alterações. Nesse sentido, o licopeno pode ser considerado uma alternativa terapêutica aos efeitos nocivos da intoxicação aguda por ZEA.

CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo mostram que o pré-tratamento com licopeno (20 mg/Kg, p.o.), durante 10 dias consecutivos em camundongos Swiss machos expostos à ZEA (40 mg/Kg, p.o.), mostrou-se eficaz em praticamente todos os parâmetros analisados e que o mesmo pode ser utilizado como uma futura alternativa terapêutica na prevenção de danos ocasionados pela ZEA.

PARÂMETROS	ZEA	LICOPENO
Reprodutivos	↓ Contagem e motilidade espermática	PREVENIU
Hormonais	↓ Níveis de Testosterona	PREVENIU
Inflamatórios	↑ IL-2, IL-6, TNF-α, IL-1β	PREVENIU
Série Branca	↑ Leucócitos Totais	PREVENIU
Série Vermelha	↓ Hemáceas e Plaquetas	PREVENIU
S. Glutationa	↓ GHS e GSH/GSSG	PREVENIU
Enzimas	↓ GST, GR e ALA-D	PREVENIU

PERSPECTIVAS

Objetiva-se verificar se a enzima produtora do hormônio testosterona (17β-Hidroxiesteróide desidrogenase) é afetada pela ação da ZEA e do licopeno. Estima-se analisar a expressão da GPx e da GR e verificar a ligação da ZEA nos receptores estrogênicos a nível testicular.

Além disso, a fim de elucidar os papéis da ZEA e do licopeno nas alterações imunológicas objetiva-se analisar outros parâmetros inflamatórios, como a PCR (proteína C reativa), Interferon γ e a mieloperoxidase além de verificar algum possível mecanismo a respeito dos genes decodificadores (NF-κB) dos parâmetros inflamatórios já analisados neste trabalho.

Em relação à imunotoxicidade da ZEA, espera-se analisar o órgão timo como forma de elucidar a alteração na produção de linfócitos T e B.

E por fim, verificar se o licopeno é capaz de modular as enzimas que atuam na síntese da glutationa: γ-glutamil-cisteína-sintetase e glutationa-sintetase.

REFERÊNCIAS

ABBES, S.; SALAH-ABBES, J. B.; OUANES, Z.; HOUAS, Z.; OTHMAN, O.; BACHA, H.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R. Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 1251-1258, 2006.

ABID-ESSEFI, S.; BOUAZIZ, C.; GOLLI-BENNOUR, E. E.; OUANES, Z.; BACHA, H. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on cultured human Caco-2 cells. **Journal of Biochemistry Molecular Toxicology,** v. 23, p. 233-243, 2009.

ABID-ESSEFI, S.; ZAIED, C.; BOUAZIZ, C.; SALEM, I. B.; KADERI, R.; BACHA, H. Protective effect of aqueous extract of Allium sativum against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2011.

AITKEN, R. J.; ROMAN, D. R. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes – a review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 14, p. 15-24, 2008.

ALSHATWI, A. A.; AL OBAAID, A. A.; SEDAIRY, A. S.; AL-ASSAF, A. H.; ZHANG, J. J.; LEI, K. Y.Tomato powder is more protective than lycopene supplement against lipid peroxidation in rats. **Nutrition Research**, v. 30, p. 66-73, 2010.

ANGUELOVA, T.; WARTHESEN, J. Degradation of lycopene, h-carotene, and i-carotene during lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, p. 71-75, 2000.

ANTONISSEN,G.; MARTEL,A.; PASMANS,F.; DUCATELLE,R.; VERBRUGGHE, E.; VANDENBROUCKE, V.; LI, S.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSEEL, F.; CROUBELS, S. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. **Toxins (Basel)**, p. 430-52, 2014.

ATESSAHIN, A.; KARAHAN, I.; TURK, G.; GUR, S.; YILMAZ, S.; CERIBASI, A. O. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. **Reproductive Toxicology**, v. 21, p. 42-7, 2006.

ATEŞŞAHIN, A.; TÜRK, G.; YILMAZ, S.; SÖNMEZ, M.; SAKIN, F.; CERIBASI, A. O. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 106, p. 479-89, 2010.

AUGUSTI, P. R. **Efeito dos carotenóides licopeno e astaxantina sobre danos renais induzidos por cloreto de mercúrio**. 97f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Toxicologia) Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), Rio Grande do Sul, 2007.

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

AYDIN, S.; PALABIYIK, S. S.; ERKEKOGLU, P.; SAHIN, G.; BAŞARAN, N.; GIRAY, B. K. The carotenoid lycopene protects rats against DNA damage induced by Ochratoxin A. **Toxicon**, v. 73, p. 96-103, 2013.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, p.497-516, 2003.

BEREK, L.; PETRI, I. B.; MESTERHAZY, A.; TEREN, J.; MOLNAR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. **Toxicology In Vitro, v.** 15, p. 25-30, 2001.

BIEHL, M. L.; PRELUSKY, D. B.; KORITZ, G. D.; HARTIN, K. E.; BUCK,W. B.; TRENHOLM, H. L. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 121, p.152–159, 1993.

BOARD, P. G.; BAKER, R. G.; CHELVANAYAGAM, G.; JERMIN, L. S. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. **Biochemical Journal**, v. 328, p. 929-35, 1997.

BOEIRA, S. P.; FILHO, C. B.; DEL'FABBRO, L.; ROYES, L. F.; JESSE, C. R.; OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F. Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. **Toxicon,** v. 60, p. 358-66, 2012.

BOEIRA, S. P.; FILHO, C. B.; DEL'FABBRO, L.; ROMAN, S. S.; ROYES, L. F.; FIGHERA, M. R.; JESSE, C. R.; OLIVEIRA, M. S.; FURIAN, A. F. Lycopene

treatment prevents hematological, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone administration in male Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 66, p. 179-85, 2014.

BORUTOVA, R.; FAIX, S.; PLACHA, I.; GRESAKOVA, L.; COBANOVA, K.; LENG, L. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers. **Archives of Animal Nutrition**, v.62, p. 303–312, 2008.

BOSE, K. S.; AGRAWAL, B. K. Effect of lycopene from cooked tomatoes on serum antioxidant enzymes, lipid peroxidation rate and lipid profile in coronary heart disease. **Singapore Medical Journal**, v. 48, p. 415-20, 2007.

BRASIL, 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC No 7, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. **Diário Oficial da União** – Ministério da Saúde, Brasília, DF, Brasil, de 22/03/2011. Dísponivel em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/bc17db804f45fe2cbd41fdd785749fbd/Resolu%C3%A7%C3%A3o+0-2011-CGALI.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 10 jun. 2014.

BUYUKLU, M.; KANDEMIR, F.; OZKARACA, M.; SET, T.; BAKIRCI, E.; TOPAL, E.; ILERITURK, M.; TURKMEN, K. Benefical effects of lycopene against contrast medium-induced oxidative stress, inflammation, autophagy, and apoptosis in rat kidney. **Human and Experimental Toxicology**, v. 32, p. 211-218, 2014.

CAMPBELL, J. K.; et al. Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. **Journal of Nutrition**, v.134, p. 3486S-3492S, 2004.

CAMPOS, F. M.; ROSADO, G. P. Novos fatores de conversão de carotenóides provitamínicos A. **Ciência e Tecnologia de Alimentos - Campinas**, v. 25, p. 571-578, 2005.

CANENE-ADAMS, K.; et al. The tomato as a functional food. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 1226-1230, 2005.

CAST. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. **Ed. Richard, L.; Payne, A.** (Task Force Report, No. 139), p. 199, 2003.

CASTEL-BRANCO, N. Substâncias antioxidantes, vitaminas e carotenóides. **Revista de Nutrição**, v. 5, p. 1-5, 2002.

CASTELLON, E. A. Influence of age, hormones and germ cells on glutathione S-transferase activity in cultured Sertoli cells. **International Journal of Andrology,** v. 22, p, 49-55, 1999.

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

CELIUS, T.; HAUGEN, T. B.; GROTMOL, T.; WALTHER, B. T. Asensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of

xenobiotics and mycotoxins. **Environmental Health Perspect**., v. 107, p. 63–68, 1999.

CHANG, H. P.; SHEEN, L. Y.; LEI, Y. P. The protective role of carotenoids and polyphenols in patients with head and neck cancer. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 14, p. 1-7, 2014.

CHATTOPADHYAY, P.; UPADHYAY, A.; AGNIHOTRI, A.; KARMAKAR, S.; GHOYARY, D.; VEER, V. Comparative hematoxicity of fusirium mycotoxin in experimental sprague-dawley rats. **Toxicology International**, v. 20, p. 25-9, 2013.

CHEN, S. S.; CHANG, L. S.; CHEN, H. W.; WEI, Y. H. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. **Human Reproduction,** v. 17, p. 718-725, 2002.

COHEN, L. A. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)**, v. 227, p. 864-68, 2002.

DÄNICKE, S.; UEBERSCHÄR, K. H.; HALLE, I.; VALENTA, H.; FLACHOWSKY, G. Excretion kinetics and metabolism of zearalenone in broilers in dependence on a detoxifying agent. **Archives of Animal Nutrition**, v. 55, p. 299–313, 2001.

D´MELLO, J. P. F.; PLACINTA, C. M.; MACDONALD, A. M. C. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, wealfare and productivity. **Animal feed science technology**, v. 80, p.183-205, 1999.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; KEDWANY, F. S.; BAGHDADI, H. H. Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and beta-carotene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p.1563-1571, 2004.

EL-DEMERDASH, F. M.; YOUSEF, M. I.; KEDWANY, F. S.; BAGHDADI, H. H. Role of a-tocopherol and b-carotene in ameliorating the fenvalerate-induced changes in oxidative stress, hemato biochemical parameters and semen quality of male rats. **Journal of Environmental Science Health B**, v. 39, p. 443–459, 2004b.

FIJAK, M.; SCHNEIDER, E.; KLUG, J.; BHUSHAN, S.; HACKSTEIN, H.; SCHULER, G.; WYGRECKA, M.; GROMOLL, J.; MEINHARDT, A. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion. **Journal of Immunology**, v. 186, p. 5162-72, 2011.

FORD, N. A.; MORAN, N. E.; SMITH, J. W.; CLINTON, S. K.; ERDMAN, J. W. An interaction between carotene-15,15'-monooxygenase expression and consumption of a tomato or lycopene-containing diet impacts serum and testicular testosterone. **International Journal of Cancer**, v. 131, p. 143-8, 2012.

FORSELL, J. H.; PESTKA, J. J. Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human

lymphocyte blastogenesis. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 50, p. 1304–1307, 1985.

FUJII, J.; IUCHI, Y.; MATSUKI, S.; ISHII, T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. **Asian Journal of Andrology**, v. 5, p. 231–242, 2003.

GABRIEL, D.; PIVETTA, L.; FOLMER, V.; SOARES, J. C.; AUGUSTI, G. R.; NOGUEIRA, C. W.; ZENI, G.; ROCHA, J. B. Human erythrocyte delta-aminolevulinate dehydratase inhibition by monosaccharides is not mediated by oxidation of enzyme sulfhydryl groups. **Cell Biology International**, v. 29, p. 669-674, 2005.

GAUMY, J. L. et al. Zéaralénone: Propriétés et toxicité expérimentale. **Revue de médecine vetérinaire,** v. 152, n. 3, p.219-234, 2001.

GIMENO, A. O impacto negativo de algumas micotoxinas nas vacas leiteiras. **Revista de Veterinária Albeitar de Portugal**, v. 4, p. 42-52, 2010.

GROMADZKA, K., WASKIEWICZ, A., CHELKOWSKI, J., GOLINSKI, P. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. **World Mycotoxin Journal**, v. 1, p. 209-220, 2008.

GUPTA, N. P.; KUMAR, R. Lycopene therapy in idiopathic male infertility-a preliminary report. **International Urology and Nephrology,** v. 34, p. 369-72, 2002.

HABIBI, B.; SEIFI, B.; MOUGAHI, S. M.; OJAGHI, M.; SADEGHIPOUR, H. R. Increases in interleukin-6 and interferon-gamma levels is progressive in immature rats with varicocele. **Irish Journal of Medical Science**s, v. 12, p. 231-240, 2014.

HAGLER, W. M.; TOWERS JUNIOR, N. R.; MIROCHA, C. J.; EPPLEY, R. M.; BRYDEN, W. L. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? In: Summerell, B. A.; Leslie, J. F.; Backhouse, D.; Bryden, W. L.; Burgess, L. W. (Ed.) ***Fusarium*. St. Paul: APS Press**, 321-331, 2001.

HASSEN, W.; AYED-BOUSSEMA, I.; OSCOZ, A. A.; LOPEZ ADE, C.; BACHA, H.The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, gluthatione depletion and stress proteins induction. **Toxicology**, v. 232, p. 294-302, 2007.

HAUSCHILD, L.; LOVATTO, P.; LEHNEN, C.; CARVALHO, A.; GARCIA, G.; MALLMANN, C. Alimentação de suínos com dietas contendo zearalenona com adição de organoaluminosilicato: digestibilidade e metabolismo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2006.

HEKIMOGLU, A.; KURCER, Z.; ARAL, F.; BABA, F.; SAHNA, E.; ATESSAHIN, A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 218, p. 141-147, 2009.

HUANG, C. S.; CHUANG, C. H.; LO, T. F.; HU, M. L. Anti-angiogenic effects of lycopene through immunomodualtion of cytokine secretion in human peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 24, p. 428-34, 2013.

HUEZA, I. M.; RASPANTINI, P.C.; RASPANTINI, L. E.; LATORRE, A. O.; GÓRNIAK, S. L. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. **Toxins (Basel)**, v. 3, p. 1-6, 2014.

JACOB, K.; PERIAGO, M. J.; BÖHM, V.; BERRUEZO, G. R. Influence of lycopene and vitamin C from tomato juice on biomarkers of oxidative stress and inflammation. **The British journal of nutrition**, v. 99, p. 1137–46, 2008.

JIA, Z.; LIU, M.; QU, Z.; ZHANG, Y.; YIN, S.; SHAN, A. Toxic effects of zearalenone on oxidative stress, inflammatory cytokines, biochemical and pathological changes induced by this toxin in the kidney of pregnant rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 580-91, 2014.

JONKER, D.; KUPER, C. F.; FRAILE, N.; ESTRELLA, A.; RODRIGEZ OTERO, C. Ninety-day oral toxicity study of lycopene from Blakeslea trispora in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 396-406, 2003.

KASAHARA, E.; SATO, E.; MIYOSHI, M.; KONAKA, R.; HIRAMOTO, K.; SASAKI, J. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. **Biochemical Journal**, v. 365, p. 849 – 856, 2002.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; KATZENELLENBOGEN, J. A., MORDECAI, D. Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β-resorcylic acid lactones. **Endocrinology,** v. 105, p. 33–40, 1979.

KHACHIK, F.; et al. Chemistry, distribuition, and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. **Experimental Biology and Medicine,** v. 227, p. 845- 851, 2002.

KORAICHI, F.; VIDEMANN, B.; MAZALLON, M.; BENAHMED, M.; PROUILLAC, C.; LECOEUR, S. Zearalenone exposure modulates the expression of ABC transporters and nuclear receptors in pregnant rats and fetal liver. **Toxicology Letters**, v. 211, p. 246-256, 2012.

KRISZT, R.; KRIFATON, C.; SZOBOSZLAY, S.; CSERHÁTI, M.; KRISZT, B.; KUKOLYA, J.; CZÉH, A.; FEHÉR-TÓTH, S.; TÖRÖK, L.; SZŐKE, Z.; KOVÁCS, K. J.; BARNA, T.;FERENCZI, S. New zearalenone biodegradation strategy using non-pathogenic Rhodococcus pyridinivorans K408 strain. **PloS One**, v. 7(9), p. 436-8, 2012.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P. M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 7, p. 253–306, 1987.

KUMAR, P.; KUMAR, A. Effect of lycopene and epigallocatechin-3-gallate against 3-nitropropionic acid induced cognitive dysfunction and glutathione depletion in rat: a novel nitric oxide mechanism. **Food and Chemical Toxicology**,v. 47, p. 2522-30, 2009.

KUMMAR, V.; BASU, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection,** v. 27, p. 891–905, 2008.

KUNZ, M.; CERESÉR, K. M.; GOI, P. D.; FRIES, G. R.; TEIXEIRA, A. L.; FERNANDES, B. S.; BELMONTE-DE-ABREU, P. S.; KAUER-SANT'ANNA, M.; KAPCZINSKI, F.; GAMA, C. S. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF-α in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 33, p. 268-74, 2011.

LEUNG, K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. **Journal Agricultural and Food Chemistry,** v. 54, p. 9623-9635, 2006.

LEVY, J.; SHARONI, Y. The Functions of Tomato Lycopene and Its Role in Human Health. HerbalGram - **Journal of the American Botanical Council**, v. 62, p. 49-56, 2004.

LI, Y.; ZHANG, B.; HUANG, K.; HE, X.; LUO, Y.; LIANG, R.; LUO, H.; SHEN, X. L.; XU, W. Mitochondrial proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying reproductive toxicity of zearalenone in MLTC-1 cells. **Toxicology**, v. 3, p. 55-67, 2014.

LIOI, M. B.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; SALZANO URSINI, V. Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. **Mutation Research**, v. 557, p. 19–24, 2004.

LIU, Q.; WANG, Y.; GU, J.; YUAN, Y.; LIU, X.; ZHENG, W.; HUANG, Q.; LIU, Z.; BIAN, J. Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression. **Toxicology in Vitro**, v. 28, p. 647-56, 2014.

LIVNY, O., et al. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junction communication of KB-1 human oral tumor cells. **Journal of Nutrition**, v. 132, p. 3754-3759, 2002.

LIZARD-NACOL, S.; COUDERT, B.; COLOSETTI, P.; RIEDINGER, J. M.; FARGEOT, P.; BRUNET-LECOMTE, P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 1, p. 81-7, 1999.

MAAROUFI, K.; CHEKIR, L.; CREPPY, E. E.; ELLOUZ, F.; BACHA, H. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. **Toxicon**, v. 34, p. 535-540, 1996.

MADEDDU, C.; GRAMIGNANO, G.; FLORIS, C.; MURENU, G.; SOLLAI, G.; MACCIÒ, A. Role of inflammation and oxidative stress in post-menopausal oestrogen-dependent breast cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 41, p. 14-21, 2014.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 96–102, 2006.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos.** 1 ed. Santa Maria: Ed. Do Autor, 240 p., 2007.

MALLIS, L. M.; SARKAHIAN, A. B.; HARRIS, H. A.; ZHANG, M. Y.; MCCONNELL, O. J. Determination of rat oral bioavailability of soy-derived phytoestrogens using an automated on-column extraction procedure and electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B,** v. 796, p. 71–86, 2003.

MANNERVIK, B. The isoenzymes of glutathione S-transferase. **Adv Enzymol.**, v. 57, p. 357-417, 1985.

MARIN, D. E.; TARANU, I.; BURLACU, R.; TUDOR, D. S. Effects ofzearalenone and its derivatives on the innate immuneresponse of swine. **Toxicon** 56, 956–963, 2010.

MARIN, D. E.; TARANU, I.; BURLACU, R.; MANDA, G.; MOTIU, M.; NEAGOE, I.; DRAGOMIR, C.; STANCU, M.; CALIN, L. Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. **Toxicology in vitro**, v. 25. p. 1981-8, 2011.

MARIN, S.; RAMOS, A. J.; CANO-SANCHO, G.; SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-37, 2013.

MARTÍNEZ, A.; STINCO, C. M.; MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A. J. Free radical scavenging properties of phytofluene and phytoene isomers as compared

tolycopene: a combined experimental and theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 98, p. 19-25, 2014.

MCNUTT, S. H.; PURWIN, P.; MURRAY, C. Vulvovaginitis in swine. **Journal of American Veterinary Medical Association,** v. 26, p. 484–92, 1928.

MEKKAWY, I. A.; MAHMOUD, U. M.; WASSIF, E. T.; NAGUIB, M. Effects of cadmium on some haematological and biochemical characteristics of Oreochromis niloticus (Linnaeus, 1758) dietary supplemented with tomato paste and vitamin E. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 37,p. 71-84, 2011.

MÍDIO, A.; MARTINS, D.; **Toxicologia dos Alimentos**, Varela Editora Livraria CTDA S. Paulo; p. 79-83, 2000.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M. E.; MARITATO, F.; MINOIA, P.; VISCONTI, A. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivates on in vitro 40 maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. **Toxicology in Vitro,** v. 15, p.489–495, 2001.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Zearalenone and reproductive function in farm animals. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, p. 2570-2584, 2008.

MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. In **Mycotoxins**, Purchase IFH (ed.). Elsevier, New York, p. 129–48, 1974.

MONBALIU, S.; POUCKE, C. V.; DETAVERNIER, C.; DUMOULIN, F.; VAN DE VELDE, M.; SCHOETERS, E. Occurrence of Mycotoxins in Feed as Analyzed by a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry***,* v. 58 (1), p. 66–71, 2010.

NIIZU, P. Y. **Fontes de carotenóides importantes para a saúde humana**. 87f. Dissertação (Mestrado em Ciência e tecnologia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), Campinas, 2003.

OLSEN, M.; PETTERSSON, H.; KIESSLING, K. H. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. **Acta Pharmacol Toxicol** (Copenh), v. 48, p. 157–161, 1981.

OSSELAERE, A.; DEVREESE, M.; GOOSSENS, J.; VANDENBROUCKE, V.; DE BAERE, S.; DE BACKER, P.; CROUBELS, S. Toxicokinetic study and absolute oral bioavailability of deoxynivalenol, T-2 toxin andzearalenone in broiler chickens. **Food Chemical and Toxicology**, v. 51, p. 350-5, 2013.

PALABIYIK, S.S.; ERKEKOGLU, P.; ZEYBEK, N. D.; KIZILGUN, M.; BAYDAR, D. E.; SAHIN, G.; GIRAY, B. K. Protective effect of lycopene against ochratoxin A induced renal oxidative stress and apoptosis in rats. **Experimental Toxicology and Pathology**, v. 65(6), p. 853-61, 2013.

PALOZZA, P.; SIMONE, R.; CATALANO, A.; MONEGO, G.; BARINI, A.; MELE, M. C.; PARRONE, N.; TROMBINO, S.; PICCI, N.; RANELLETTI, F. O. Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF-κB nuclear binding and increase in

PPARγ expression. **The Journal of Nutritional Biochemistry,** v. 22, p. 259–268, 2011.

PARK, S. K.; KANG, D.; NOH, D. Y.; LEE, K. M.; KIM, U.; CHOI, J. Y.; AHN, S.H.; HIRVONEN, A.; STRICKLAND, P.; YOO, Y. Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment,** v.78, p. 89-96, 2003.

PAULA, T. P, PERES, W. A. F., CARMO, M. G. T. Carotenoids in treatment and prevention of cancer. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, p. 100-8, 2004.

PENNATHUR, S.; MAITRA, D.; BYUN, J.; SLISKOVIC, I.; ABDULHAMID, I.; SAED, G.; DIAMOND, M.; ABU-SOUD, H. M. Potent antioxidative activity of lycopene: A potential role in scavenging hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, p. 205-213, 2010.

PÉREZ, C. V.; THEAS, M. S.; JACOBO, P. V.; JARAZO-DIETRICH, S.; GUAZZONE, V. A.; LUSTIG, L. Dual role of immune cells in the testis: Protective or pathogenic for germ cells?. **Spermatogenesis**, v. 3, p. 238-70, 2013.

PESTKA, J. J.; TAI, J. H.; WITT, M. F.; DIXON D.; FORSELL, J. H. Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, p. 297–304, 1987.

PORCU, O. M. **Fatores que influenciam na composição de carotenóides em goiaba, acerola, pitanga e seus produtos processados.** 135f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

PRASAD, A. K.; MISHRA, P. C. Modeling the mechanism of action of lycopene as a hydroxyl radical scavenger. **Journal of Molecular Modeling**, v. 20(5), p. 22-33, 2014.

PRELUSKY, D. B.; WARNER, R. M.; TRENHOLM, H. L. Sensitive analysis of the mycotoxin zearalenone and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 494, p. 267–277, 1989.

RAFI, M. M.; KANAKASABAI, S.; REYES, M. D.; BRIGHT, J. J. Lycopene modulates growth and survival associated genes in prostate cancer. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1724–1734, 2013.

RAGO, V.; SICILIANO, L.; AQUILA, S.; CARPINO, A. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. **Reproductive Biology and Endocrinology,** v. 4, p. 36, 2006.

RAO, A. V.; AGARWAL, S. Role of Antioxidant Lycopene in Cancer and Heart Disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 5, p.563–569, 2000.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Brazil: a bounty of carotenoid source. **Sight and life newsletter**, v.4, p.3-9, 2002.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Latin American food sources of carotenoids. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.49, n.1, p.74-84, 1999.

RODRÍGUEZ-CARRASCO, Y.; MOLTÓ, J. C.; MAÑES, J.; BERRADA, H. Development of a GC-MS/MS strategy to determine 15 mycotoxins and metabolites in human urine. **Talanta**, v. 128, p. 125-31, 2014.

SALAH-ABBÈS, J. B, ABBÈS, S.; OUANES, Z.; HOUAS, Z.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; BACHA, H.; OUESLATI, R. Tunisian radish extract (Raphanus sativus) enhances the antioxidant atatus and protects against oxidative stress induced by zearalenone in Balb/c mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 6-14, 2008a.

SALAH-ABBÈS, J. B.; ABBÈS, S.; HOUAS, Z.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R. Zearalenone induces immunotoxicity inmice: possible protective effects of radish extract (*Raphanussativus)*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 761–770, 2008b.

SALAH-ABBÈS, J. B., ABBÈS, S., ABDEL-WAHHAB, M., OUESLATI, R. Immunotoxicity of zearalenone in Balb/c mice in a high subchronic dosing study counteracted by Raphanus sativus extract. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v.32, p. 628–636, 2010.

SALAH-ABBES, J. B.; ABBES, S.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R. Raphanus sativus extract protects against ZEN-induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. **Toxicon,** v. 53, p 525-533, 2009.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. **Food Control,** v. 13, p. 87–92, 2002.

SALEM, E. A.; SALEM, N. A.; MAAROUF, A. M.; SEREFOGLU, E. C.; HELLSTROM, W. J. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. **Urology**, v. 79, p. 1-6, 2012.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology,** v. 2, p. 1–7, 2004.

SETIAWAN, B.; SULAEMAN, A.; GIRAUD, D. W.; DRISKELL, J. A. Carotenoid contend of selected Indonesian fruits. **Journal of food Composition and Analysis**, v. 14, p.169-76, 2001.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição Campinas**, v. 17, p. 227-236, 2004.

SHIN, B. S.; HONG, S. H.; BULITTA, J. B.; HWANG, S. W.; KIM, H. J.; LEE, J. B.; YOON, H. S.; KIM, D. J.; YOO, S. D. Dose-linearity of pharmacokinetics,

oral absorption and tissue distribution of zearalenone in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 72, p. 21-22, 2009.

SILER, U.; et al. Lycopene effects on rat normal prostate and prostate tumor tissue. **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2050S- 2052S, 2005.

SOBROVA, P.; ADAM, V.; VASATKOVA, A.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology***,* v. 3, p. 101-106, 2010.

STABILE, V.; RUSSO, M.; CHIEFFI, P. 17beta-estradiol induces Akt-1 through estrogen receptor-beta in the frog (Rana esculenta) male germ cells. **Reproduction**, v. 132, p. 477-484, 2006.

STADNIK, A.; WÓJTOWICZ-CHOMICZ, K.; BORZĘCKI, A. Influence of Zearalenone on Free Radical Reactions in Rat Liver Cells. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy,** v. 54, p. 611-615, 2010.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 345-51, 2003.

STOB, M.; BALDWIN, R. S.; TUITE J.; AMDREWS, F. N.; GILLETTE, K. G. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with Gibberella zeae. **Nature**, v. 29, p. 1318, 1962.

SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T.; NOGOWSKI, L. Daidzein, coumestrol and zearalenone affect lipogenesis and lipolysis in rat adipocytes. **Phytomedicine,** v. 9, p. 338-345, 2002.

TANG, L.; et al. Lycopene inhibits the growth of human androgen-independent prostate cancer cells in vitro and in BALB/c nude mice. **Journal of Nutrition**, v.135, p. 287- 290, 2005.

TAS, M.; SARUHAN, B. G.; KURT, D.; YOKUS, B.; DENLI, M. Protective Role of Lycopene on Aflatoxin B1 Induced Changes Sperm Characteristics and Testicular Damages in Rats. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,** v. 16, p. 597-604, 2010.

TIEMANN, U.; DANICKE, S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. **Food Additives and Contaminants,** v. 24, p. 306-314, 2007.

TIMBRELL, J. **Principles of Biochemical Toxicology**. 3°ed. Philadelphia, Taylor & Francis, chapter 6, p. 200, 2000.

TIUZZI, M. **Licopeno e câncer: bases biomoleculares**. 27f. Monografia (Pós Graduação em Nutrição Clinica). Ganep, 2008.

TORRADO, E. **Caracterização do micobiota em milhos e alimentos compostos para suínos.** Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Agronomia- Universidade Técnica de Lisboa para obtenção do grau de Licenciado em Biologia, orientada por Hermínia Marina Martins, Lisboa, 2007.

TOWNER, R.; QIAN, S.; KADIISKA, M.; MASON, R. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1330–1340, 2003.

TURK, G.; CERIBASI, A. O.; SAHNA, E.; ATESSAHIN, A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. **Phytomedicine**, v. 18, p. 356-361, 2011.

UENO, Y.; AYAKI, S.; SATO, N.; ITO, T. Fate and mode of action of zearalenone. **Annales de la Nutrition et de Alimentation,** v. 31, p. 935–48, 1977.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, p. 2429-2436, 2009.

VANI, G. T.; MUKESH, N.; PRASAD, B. S.; DEVI, P. R.; PRASAD, M. H.; RANI, P. U.; PARDHANANDANA, R. P. Role of glutathione S-transferase Mu-1 (GSTM1) polymorphism in oligospermic infertile males. **Andrologia**, v. 42, p. 213–217, 2010.

VEKIRU, E., HAMETNER, C., MITTERBAUER, R., RECHTHALER, J., ADAM, G., SCHATZMAYR, G. Cleavage of Zearalenone by *Trichosporon* mycotoxinivorans to a Novel Nonestrogenic Metabolite, **Applied And Environmental Microbiology**, v. 76, p. 2353–2359, 2010.

VLATA, Z.; PORICHIS, F.; TZANAKAKIS, G.; TSATSAKIS, A.; KRAMBOVITIS, E. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology Letters,** v. 165, p. 274–81, 2006.

WALISZEWSKI, K. N.; BLASCO, G. Propiedades nutraceúticas Del licopeno. **Salud pública de México**, v.52, p. 254-265, 2010.

WAN, L.; TAN, H. L.; THOMAS-AHNER, J.; PEARL, D. K.; MORAN, N. E.; CLINTON, S. K. Dietary tomato and lycopene impact androgen signaling- and carcinogenesis-related gene expression during early TRAMP prostate carcinogenesis. **Cancer Prevention Research**, v. 45, p. 242-251, 2014.

WANG, Y.; DENG, J. L.; XU, S. W.; PENG, X.; ZUO, Z. C.; CUI, H. M.; WANG, Y.; REN, Z. H. Effects of zearalenone on IL-2, IL-6, and IFN-γ mRNA levels in the splenic lymphocytes of chickens. **Scientific World Journal**, v.11, p. 567-327, 2012.

XIANQUAN, S.; et al. Stability of Lycopene During Food Processing and Storage. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 4, p. 413–422, 2005.

YANG, J. Y.; WANG, G. X.; LIU, J. L.; FAN, J. J.; CUI, S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. **Reproductive Toxicology,** v. 24, p. 381-387, 2007.

YAPING, Z.; WENLI, Y.; WEILE, H.; YING, Y. Anti-inflammatory and anticoagulant activities of lycopene in mice. **Nutrition Research,** v. 23, p. 1591–1595, 2003.

YEGANI, M., SMITH T.; LEESON S.; BOERMANS, H. Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of broiler breeders. **Poultry Science**, v. 85, p.1541–1549, 2006.

YILMAZ, S.; ATESSAHIN, A.; SAHNA, E.; KARAHAN, I.; OZER, S. Protective effect of lycopene on adriamycin-induced cardiotoxicity and nephrotoxicity.**Toxicology**, v. 218, p.164-71, 2006.

YOUSEF, M. I.; ABDALLAH, G. A.; KAMEL, K. I. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v. 2352, p. 1–13, 2003.

ZANINI, D.; PELINSON, L. P.; SCHMATZ, R.; BELMONTE, L.; CURRY, C.; BALDISSARELI, J.; PIRES, G.; ANTUNES, F. A.; BRENNER, L. G.; ARAÚJO, C.; CHIESA, J.; MORSCH, V. M.; BITENCOURT, D.; SCHETINGER, M. R. δ-aminolevulinate dehydratase activity in lung cancer patients and its relationship with oxidative stress. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 68, p. 603-9, 2014.

ZHENG, W.; WEN, W. Q.; GUSTAFSON, D. R.; GROSS, M.; CERHAN, J.R.; FOLSOM, A. R. GSTM1 and GSTT1 polymorfisms and postmenopausal breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment,** v. 74, p. 9-16, 2002.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTO, J. C.; MAÑES, J***.*** Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin***.*** **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1–18, 2007.

ZHU, C. C.; HOU, Y. J.; HAN, J.; CUI, X. S.; KIM, N. H.; SUN, S. C. Zearalenone exposure affects epigenetic modifications of mouse eggs. **Mutagenesis**, 2014.