

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

**EFEITO GENOPROTETOR *IN VITRO* DE β -GLUCANAS
SOBRE LINFÓCITOS DE FRANGOS (*Gallus gallus
domesticus*) EXPOSTOS À AFLATOXINA B₁**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carine Eloise Prestes Zimmermann

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**EFEITO GENOPROTETOR *IN VITRO* DE β -GLUCANAS
SOBRE LINFÓCITOS DE FRANGOS (*Gallus gallus domesticus*)
EXPOSTOS À AFLATOXINA B₁**

Carine Eloise Prestes Zimmermann

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia Aplicada à Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS, Brasil

2013

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**EFEITO GENOPROTETOR *IN VITRO* DE β -GLUCANAS SOBRE
LINFÓCITOS DE FRANGOS (*Gallus gallus domesticus*) EXPOSTOS À
AFLATOXINA B₁**

elaborada por
Carine Eloise Prestes Zimmermann

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Janio Morais Santurio, Dr.
(Presidente/Orientador)

Daniela Bitencourt Rosa Leal, Dra. (UFSM)

Érico Silva de Loreto, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 29 de agosto de 2013.

Dedico

*Aos meus pais, João Carlos e Maria Renir,
pelo apoio de modo incondicional e por
todo amor que sempre me deram.*

*Ao meu orientador, Prof^o. Janio, pela
oportunidade e confiança.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, força maior do universo, que me proporcionou saúde e energia necessária para seguir em frente, amparando-me nos momentos difíceis e mostrando-me o caminho nas horas incertas.

Aos meus pais, pelo exemplo de caráter e dignidade, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Obrigada pelo incentivo e por estarem sempre ao meu lado. Amo muito vocês!

A minha irmã Bruna pelo carinho, cumplicidade, incentivo e por acreditar no meu trabalho e potencial. Mana te amo muito!

Ao meu orientador Prof^o. Janio Santurio pelo apoio, motivação e em especial pela sabedoria compartilhada durante todos esses anos. Meus sinceros agradecimentos.

A Prof^a. Daniela Leal pelos ensinamentos ao longo de minha formação acadêmica, e principalmente pela amizade e confiança.

A Prof^a. Ivana Cruz, meus sinceros agradecimentos por toda colaboração, apoio e dedicação no desenvolvimento dos trabalhos que constituem essa dissertação.

Aos meus estimados amigos Jeandre, Cássia, Letícia, Karine, Cristiana e Fernanda pela valiosa amizade e apoio incondicional em todas as circunstâncias.

Aos meus amigos e colegas do laboratório Biogenômica Alencar, Francine e Charles agradeço de coração pelas horas de trabalhos e pelos momentos difíceis que sempre foram encarados com bom humor e com a certeza de que tudo daria certo.

Aos meus amigos e colegas do Laboratório 4229, pelo apoio e amizade durante todos esses anos de convivência.

Aos amigos e colegas do LAPEMI, Francielli, Andressa, Maiara, Carmen, Aline, Fernanda, Marcela, Cláudia, Karine, Carla, Érico, Juliana e Prof^o. Sydney, pela amizade, companheirismo, incentivo e distrações. Também agradeço ao Régis, por todo apoio e dedicação na reta final da dissertação. E a Maria Isabel, que sempre esteve ao meu lado, auxiliando e motivando-me em toda essa caminhada. Vocês foram simplesmente essenciais.

Aos meus professores e colegas por todos os ensinamentos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por oferecer a nós alunos um curso de inestimável qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo.

Àqueles que não foram citados, mas que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

“O maior ativo que alguém pode ter, são pessoas que acreditam em sua capacidade”.

“Todas as vezes que se comprometer a fazer algo na vida, procure fazer do melhor modo,
com honestidade, sinceridade e, acima de tudo, com bom senso e sensibilidade.

Faça de sua vida uma eterna conquista rumo ao conhecimento,
à grandeza do ser, à autenticidade e
será sempre um vencedor”.

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

EFEITO GENOPROTETOR *IN VITRO* DE β -GLUCANAS SOBRE LINFÓCITOS DE FRANGOS (*Gallus gallus domesticus*) EXPOSTOS À AFLATOXINA B₁

Autora: Carine Eloise Prestes Zimmermann

Orientador: Dr. Janio Morais Santurio

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de agosto de 2013.

A aflatoxina B₁ (AFB₁) é uma das principais micotoxinas que podem ser identificadas em alimentos, possuindo relevância agroeconômica e para a saúde pública, por ser considerada imunotóxica. Um sistema imune funcional é um requisito básico para uma vida saudável na produção moderna de animais. A interação envolvendo nutrição e imunidade é um fator estratégico para obter um bom desempenho em frangos de corte. Devido as suas atividades imunomodulatórias, substâncias como as β -glucanas proporcionam ao hospedeiro uma maior capacidade de resistir a infecções oportunistas. Para melhor compreender o mecanismo de ação das β -glucanas, sobre os linfócitos de frangos de corte, investigou-se os efeitos das concentrações de 0,1, 1 e 10% de β -glucanas derivadas do fungo *Saccharomyces cerevisiae* em linfócitos expostos a crescentes concentrações de AFB₁ (0, 0,1, 1, 10, 20 μ g/ml). Os linfócitos foram separados através do reagente de densidade Ficoll-Histopaque e cultivados em placas de 96 poços, contendo as concentrações de AFB₁ e/ou β -glucanas em atmosfera de 5% de CO₂ a 39°C durante 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade celular foi avaliada através dos testes MTT e PicoGreen[®], e a formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) através do ensaio 2'-7'- diacetato diclorofluoresceína. Também foi utilizado o teste cometa para elucidar os danos ao DNA. A viabilidade celular reduziu na presença de 10 μ g/ml de AFB₁ em 48 h ($p < 0.05$) e em 10 and 20 μ g/ml de AFB₁ ($p < 0.01$ e $p < 0.001$, respectivamente) em 72 h quando comparada ao grupo controle. Além disso, as concentrações de AFB₁ > 1 μ g/ml aumentaram significativamente ($p < 0.001$) a liberação de fita dupla de DNA (dsDNA) e a produção de EROS em 24 h. Os danos causados ao DNA foram confirmados através do momento cauda do cometa e aumentaram cerca de 2,3 vezes em linfócitos expostos a 20 μ g/ml de AFB₁ quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, as β -glucanas exerceram efeitos citoprotetores ($p < 0.001$), sendo que a concentração de 1% foi capaz de reverter os danos genotóxicos causados pela ação da AFB₁. Já a concentração de 10% de β -glucanas aumentou significativamente ($p < 0.001$) a formação de EROS, potencializando a ação da AFB₁. Em conclusão, este estudo evidenciou que a AFB₁ e as β -glucanas exercem influência sobre o metabolismo oxidativo dos linfócitos e possui efeito potencializador dose-dependente. Os resultados também evidenciaram o efeito genoprotetor *in vitro* de β -glucanas em linfócitos de frangos expostos a AFB₁, sendo a concentração de β -glucanas a 1% capaz de manter a integridade do DNA.

Palavras-chave: Aflatoxina B₁. β -glucana. Linfócitos. Frangos de corte. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

***IN VITRO* GENOPROTECTIVE EFFECT OF β -GLUCANS ON BROILER CHICKEN (*Gallus gallus domesticus*) LYMPHOCYTES EXPOSED TO AFLATOXIN B₁**

Author: Carine Eloise Prestes Zimmermann
Adviser: Dr. Janio Morais Santurio
Place and Date: August 29th, 2013, Santa Maria.

The aflatoxin B₁ (AFB₁) is one of the main mycotoxins that can be identified in foods, and has relevance for agricultural economics and public health because of its immunotoxic properties. A functional immune system is a basic requirement for a healthy life in modern animal production. The interaction involving nutrition and immunity is a strategic factor to obtain a high quality performance in the poultry industry. Immunomodulators such as β -glucans have an immunostimulating activity, which enables the host ability to resist opportunistic infections. To contribute to the elucidation of the mechanism of action of β -glucans in broiler chicken lymphocytes, the effects of the concentrations of 0.1, 1 and 10% of β -glucans derived from *Saccharomyces cerevisiae* were investigated in lymphocytes exposed to increasing concentrations of AFB₁ (0, 0.1, 1, 10, 20 μ g/ml). Lymphocytes were separated by Ficoll-Histopaque density and cultured in 96 well-plates containing AFB₁ and/or β -glucans in a 5% CO₂ atmosphere at 39°C. MTT, PicoGreen[®] and 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate cytotoxicity tests were evaluated at 24, 48 and 72 h of incubation. The comet assay to elucidate the DNA damage was also performed. The percentage of viable cells decreased in the presence of 10 μ g/ml AFB₁ at 48 h ($p < 0.05$) and 10 and 20 μ g/ml AFB₁ at 72 h ($p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively), when compared to the control group (0 μ g/ml). Furthermore, an increase in cell-free DNA in AFB₁ concentrations > 1 μ g/ml ($p < 0.001$) and the generation of ROS at 24 h were also observed. DNA damage increased approximately 2.3 fold in lymphocytes exposed to 20 μ g/ml of AFB₁ when compared to the control group. Conversely, β -glucans showed cytoprotective effects ($p < 0.001$), and the concentration of 1% reverted the AFB₁-induced lymphocyte damage. β -glucans at 10% significantly increased ($p < 0.001$) the formation of reactive oxygen species (ROS), potentiating the AFB₁-induced ROS formation. In conclusion, this study showed that AFB₁ and β -glucans exert influence on lymphocyte oxidative metabolism and have dose-dependent potentiating effects. The results also showed genoprotective *in vitro* effect of β -glucans in poultry lymphocytes exposed to AFB₁, being the concentration of 1% β -glucans able to maintain DNA integrity.

Keywords: Aflatoxin B₁. β -glucans. Lymphocytes. Broiler chickens. Genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Estrutura molecular das AFB ₁ , AFG ₁ , AFM ₁ , AFB ₂ , AFG ₂ e AFM ₂	17
Figura 2 - Metabolismo da AFB ₁ no fígado de aves.....	19
Figura 3 - Conformação da AFB ₁ dentro da estrutura da β -glucana.....	26

MANUSCRITO 1

Figure 1 - Free dsDNA quantification.....	42
Figure 2 - Intracellular formation of ROS measured by the DCFH-DA assay.....	43

MANUSCRITO 2

Figure 1 - Cell viability in broiler chicken lymphocytes culture.....	60
Figure 2 - Double-stranded DNA supernatant levels at 24 h in broiler chicken lymphocytes culture.....	61
Figure 3 - DNA Comet image of broiler chicken lymphocytes showing nucleus without damage, and the nucleus with different damage levels.....	62
Figura 4 - Effect of β -glucan on AFB ₁ -induced broiler chicken lymphocyte DNA damage measured by the tail moment.....	63

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO 1

Tabela 1 - Cell viability of broiler chicken lymphocytes incubated for 24, 48 and 72 h at increasing concentrations of AFB₁.....44

MANUSCRITO 2

Tabela 2 - Effect of different β -glucan (β G) concentrations on reactive oxygen species (ROS) levels of broiler chicken lymphocytes exposed to 20 μ g/ml AFB₁..... 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB ₁	aflatoxina B ₁
AFB ₁ -8,9 epóxido	epóxido de aflatoxina
AFL	aflatoxina (s)
APC	células apresentadoras de antígenos
CYP-450	citocromo P-450
DCFH-DA	2'-7'- diacetato diclorofluoresceína
EROS	espécies reativas de oxigênio
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etano- sulfônico
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NK	<i>natural killer</i>
OD	densidade óptica
PAMP	padrão molecular associado a patógeno
PIB	produto interno bruto
PRR	receptores de reconhecimento de padrões moleculares
TLR	receptores <i>toll-like</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
Avicultura Brasileira.....	14
Micotoxinas	15
Aflatoxinas	16
Toxicocinética da AFB ₁	17
Efeitos Biológicos da AFB ₁	19
Imunidade das Aves	20
Estrutura do Sistema Imunológico	22
Imunomoduladores	23
β-glucanas	24
OBJETIVOS	28
Objetivo Geral	28
Objetivos específicos	28
MANUSCRITO 1 – <i>IN VITRO</i> CYTOTOXICITY OF AFLATOXIN B₁ ON LYMPHOCYTES OF BROILER CHICKENS	29
Abstract.....	31
Introduction	32
Materials and Methods	33
Results	36
Discussion.....	36
References	39
MANUSCRITO 2 – GENOPROTECTIVE EFFECT OF β-GLUCAN AGAINST AFLATOXIN B₁-INDUCED DNA DAMAGE IN BROILER CHICKEN LYMPHOCYTES	45
Abstract.....	47
Introduction	48
Materials and Methods	48
Results	52
Discussion.....	53
References	56
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscritos. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se nos próprios manuscritos e representam a íntegra deste estudo.

Os itens Discussão e Conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os manuscritos contidos neste trabalho.

As referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Discussão desta dissertação.

Os manuscritos estão estruturados de acordo com as normas das revistas científicas nas quais se encontram submetidos:

Manuscrito 1: Environmental Toxicology and Pharmacology

Manuscrito 2: Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

INTRODUÇÃO

Doenças de origem alimentar geralmente resultam da ingestão de alimentos contaminados com microrganismos, especialmente fungos e toxinas. Substâncias tóxicas, como a aflatoxina B₁ (AFB₁) ocorrem naturalmente em alimentos e rações podendo afetar negativamente a qualidade nutricional, segurança alimentar e a saúde humana e animal (YUNUS et al., 2011). Devido a uma crescente preocupação com as relações entre dieta, doenças e segurança no abastecimento de alimentos, pesquisas são necessárias para definir condições que minimizem os níveis de compostos tóxicos em produtos alimentícios de origem animal e vegetal e assim evitar numerosas vítimas por “toxinfecções” alimentares (OUESLATI et al., 2012; FRIEDMAN; RASOOLY, 2013).

Avicultura Brasileira

A cadeia produtiva de frangos de corte no Brasil encontra-se em constante crescimento e assegura ao país a posição de terceiro maior produtor e o mantém na posição de maior exportador mundial desde 2004 (U.B.A., 2013). Fatores como, o crescimento tecnológico, avanços na genética, nutrição e manejo animal são responsáveis por este progresso aliados à qualidade e preços acessíveis. Outro fator favorável é a disponibilização de matéria-prima para a alimentação do plantel, como o milho e o trigo, que o Brasil produz em grande escala. O setor emprega mais de 4,5 milhões de pessoas e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. As indústrias de carne de aves estão concentradas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país (U.B.A., 2012).

Neste âmbito, deve-se salientar que a produção de grãos em algumas regiões do Brasil é desfavorecida pelo clima tropical e subtropical, que favorecem o desenvolvimento de fungos e de seus contaminantes, as micotoxinas, que estão associadas a perdas consideráveis nos aviários por contaminarem rações (QUEIROZ et al., 2013).

Micotoxinas

Os fungos filamentosos produzem diversos metabólitos secundários denominados micotoxinas, que se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, como milho, trigo, amendoim, cevada, centeio entre outros. As micotoxinas são consideradas compostos biológicos naturais de baixo peso molecular, alta lipossolubilidade, estáveis sob calor intenso e normalmente tóxicas (IHESHIULOR et al., 2011). Por não possuírem natureza proteica, as micotoxinas não são imunogênicas, diferenciando-se das toxinas bacterianas (TESSARI; CARDOSO, 2012). As enfermidades causadas pelos metabólitos secundários são denominadas de micotoxicoses, que acometem tanto os animais quanto os humanos (OUESLATI et al., 2012).

A exposição humana as micotoxinas pode ocorrer através do consumo de alimentos contaminados de origem animal ou grãos, e está associada à ocorrência de casos de câncer e efeitos deletérios em recém-nascidos (SHUAIB et al., 2010). As intoxicações são caracterizadas por síndromes difusas, que causam lesões em vários órgãos, como fígado, rins, tecido epitelial e sistema nervoso, dependendo do tipo de toxina (BBOSA et al., 2013).

Vários fatores biológicos, químicos e físicos contribuem para a ocorrência dos metabólitos secundários de fungos na cadeia alimentar, dentre eles, temperatura, umidade, susceptibilidade da planta, danos por insetos ou mecânicos durante a colheita. É relevante salientar, que a maioria das micotoxinas apresentam grande estabilidade química, o que favorece a sua constância nos grãos e alimentos em gerais (FILAZI; SIRELI, 2013). Logo, é importante ter controle dos níveis de contaminação dos alimentos nas etapas de produção, armazenamento, processamento e distribuição dos grãos para evitar possíveis intoxicações e enfermidades mais graves (MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2010).

As cepas dos fungos *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* são as mais frequentemente encontradas como invasoras de culturas de grãos (MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2010). As principais micotoxinas identificadas em alimentos, de relevância agroeconômica e para a saúde pública são as aflatoxinas (AFL), ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas. As AFL merecem destaque pela frequente ocorrência e também pelo elevado potencial toxigênico demonstrado em aves de produção (BBOSA et al., 2013).

Aflatoxinas

Desde a descoberta da AFL na década de 1960, as diversas micotoxinas têm suscitado grandes preocupações em saúde pública devido à ocorrência generalizada em alimentos para animais e alimentos humanos (OUESLATI et al., 2012). A partir deste acontecimento identificou-se que esta importante toxina era produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, contaminante do bagaço de amendoim proveniente do Brasil (HOPMANS, 1997). Em 1961, investigadores ingleses do *Tropical Products Institut* descobriram que o *A. flavus* produzia uma substância tóxica. A partir de 1962 descobriu-se que a AFL era um potente hepatocarcinógeno natural para os animais e humanos, o que instigou estudos da possível relação entre a exposição e o câncer (PERAICA et al., 1999).

A contaminação de alimentos e rações por fungos produtores de AFL é um problema de saúde pública recorrente e estima-se que cerca de 4,5 bilhões de pessoas correm o risco de exposição crônica à AFL (WILLIAMS et al., 2004). As AFL são produzidas principalmente pelo *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius* (CALVO, 2005). Existem 18 tipos de AFL, sendo as de maior interesse as AFL B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁(AFG₁) e G₂ (AFG₂) (Fig. 1), de ocorrência natural em vários produtos como milho, amendoim, sorgo, trigo e castanha (LEONG et al., 2012). As AFL M₁ (AFM₁) e AFM₂ são encontradas no leite, carne, ovos e urina, originárias da biotransformação das AFB₁ e AFB₂ pelo organismo após ingestão de alimentos contaminados (FILAZI; SIRELI, 2013; MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2010). O Brasil apresenta limites regulatórios para a presença de AFL e outras micotoxinas em alimentos, sendo que a AFL não deve ser superior a 20 µg/Kg (BRASIL, 2011).

As AFL pertencem ao grupo das bifuranocumarinas e são formadas por moléculas heterocíclicas, com átomos de oxigênio e anéis de difurano. Estas micotoxinas são moléculas de baixo peso molecular, possuem estruturas químicas e físicas semelhantes e são solúveis em solventes orgânicos moderadamente polares como o metanol e o etanol. Receberam a designação B ou G devido à propriedade de emitirem coloração azul (“blue”) e verde (“green”) sob a luz ultravioleta (GOMPERTZ et al., 2008).

Representam boas condições, para a produção de AFL, temperaturas entre 12°C e 42°C (MIDIO; MARTINS, 2000), umidade relativa do ar de 80 a 85% com atividade de água superior a 0,8 (KOBASHIGAWA, 2010). Quando expostas a temperaturas acima de 100°C, as AFL demonstram pequena ou nenhuma decomposição, como consequência, não são eliminadas nas condições normais de processamento dos alimentos (cozimento, pasteurização, torrefação, entre outros) (MIDIO; MARTINS, 2000).

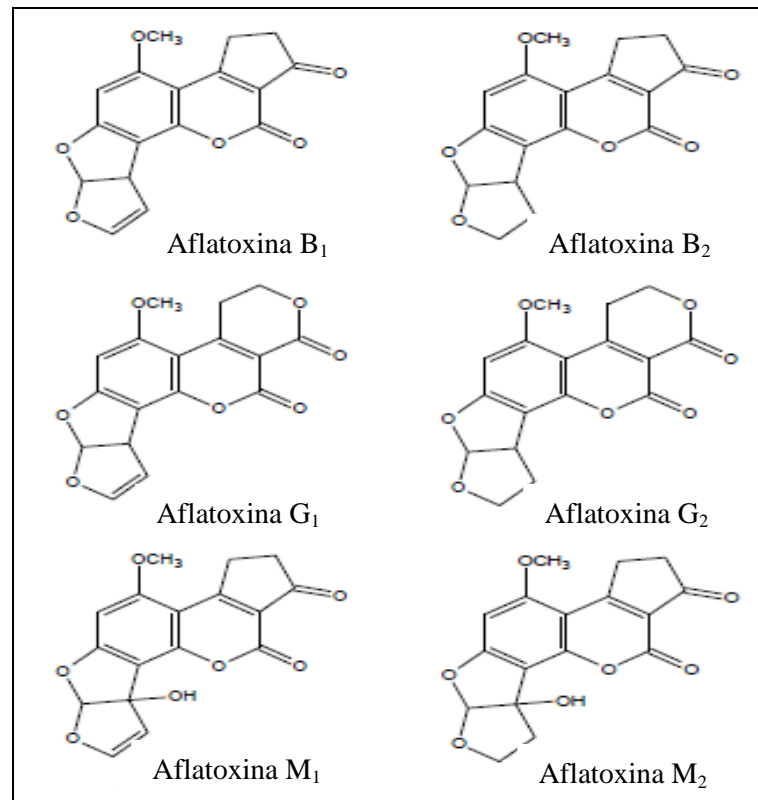


Figura 1– Estrutura molecular das AFB₁, AFG₁, AFM₁, AFB₂, AFG₂ e AFM₂. Fonte: Yunus et al. (2011).

A AFB₁ é reconhecida como o carcinógeno natural mais potente (MATSUDA et al., 2013), sendo classificada na classe 1 dos carcinógenos humanos pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 1993). Embora o fígado seja o principal alvo, a exposição respiratória às AFL, por intermédio da inalação de poeiras, pode contribuir significativamente para a incidência de câncer no trato respiratório, como o pulmonar (YANG et al., 2013).

Toxicocinética da AFB₁

A AFB₁ é absorvida imediatamente, após a sua ingestão, pelo trato gastrointestinal por difusão passiva e difundi-se rapidamente, com o auxílio principalmente da albumina e outras proteínas, por todos os tecidos do organismo, concentrando-se nos rins e fígado (SANTURIO, 2000; LEONG et al., 2012). A capacidade de detoxificação da AFB₁, pelos animais, varia entre as diferentes espécies e também é influenciada por fatores, como sexo, idade, estado de

saúde e alimentação (MARAI; ASKER, 2008). A AFB₁ é considerada um pró-neoplásico, pois requer ativação para que possa exercer seus efeitos tóxicos (LEONG et al., 2012).

A biotransformação da AFB₁ ocorre especialmente no fígado, onde é metabolizada e seus metabólitos ligam-se aos ácidos nucleicos e proteínas, sendo que parte desta metabolização também pode ocorrer nos rins. As enzimas microssomais do citocromo (CYP) P-450, do fígado e de outros tecidos, convertem AFB₁ em metabólitos epóxidos (AFB₁-8,9-exo-epóxido e AFB₁-8,9-endo-epóxido) e aflatoxicol (YUNUS et al., 2011) (Fig. 2). O metabólito AFB₁-8,9-exo-epóxido pode realizar ligações covalentes a sítios nucleofílicos em constituintes intracelulares, incluindo DNA e RNA formando adutos, como AFB₁-N₇-guanina ou lisina (MARAI; ASKER, 2008).

O metabolismo da AFB₁ também induz formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), que em excesso causam desequilíbrios oxidativos, conduzindo a alterações nas funções e na viabilidade celular em nível de DNA, proteínas e oxidação lipídica (MARIN; TANARU, 2012). Este desequilíbrio pode ser devido à diminuição de antioxidantes endógenos ou ingestão insuficiente na dieta, que resultam na acumulação de EROS em componentes celulares e implicando em doenças degenerativas e sistema imunológico ineficiente (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Assim, um importante sistema de defesa enzimático contra o aumento de radicais livres, envolve as enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e redutase, que apresentam associações com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo (ROVER JÚNIOR et al., 2001; POURAHMAD et al., 2010).

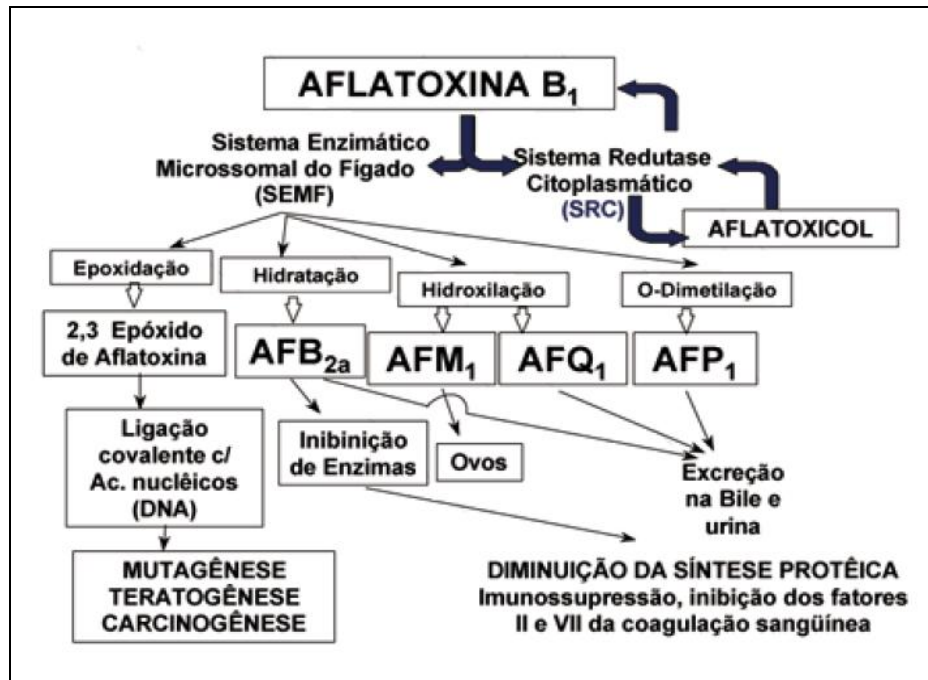


Figura 2 – Metabolismo da AFB₁ no fígado de aves. Fonte: Santurio (2000).

Segundo Giambone e colaboradores (1978), as AFL têm um efeito significativo sobre imunidade mediada por células em aves, causando depressão no sistema imunológico, diminuindo a produção de imunoglobulinas e a resistência a doenças infecciosas, assim como sobre a imunidade adquirida induzida pela vacinação (OSWALD; COMERA, 1998).

Efeitos Biológicos da AFB₁ nas aves

Após a difusão e biotransformação da AFB₁ pelo organismo os efeitos começam a ser observados em curto espaço de tempo. Os efeitos tóxicos são dependentes da dose, tempo de exposição, idade e estado nutricional (MARAI; ASKER, 2008) determinando assim, intoxicações agudas ou crônicas.

A toxicose aguda ocorre pela ingestão de alimentos com doses elevadas de AFL. Análises histopatológicas demonstraram icterícia, morte de hepatócitos, além de febre baixa, depressão, anorexia, diarreia e alterações gordurosas degenerativas no fígado (PATERSON; LIMA, 2010). Ocorrem alterações também no tamanho dos órgãos internos, como fígado, baço e rins, enquanto a bursa de Fabrício e o timo diminuem (TESSARI; CARDOSO, 2012).

A toxicose crônica ocorre através da ingestão de alimentos contaminados com baixos níveis, por períodos prolongados, de forma contínua ou intermitente, sendo a principal forma de intoxicação em condições naturais. Costuma-se observar letargia, reduzida produção de ovos, vesícula biliar inchada, diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens e imunossupressão (LEESON et al., 1995; TESSARI; CARDOSO, 2012). Pela demora na percepção desta patologia e pelo difícil diagnóstico clínico, os animais ficam predispostos a infecções secundárias como salmonelose, coccidiose e candidíase, o que tornam as perdas econômicas evidentes (FILAZI; SIRELI, 2013).

Analisando as alterações histopatológicas do fígado de frangos de corte, Tessari e colaboradores (2006) observaram degeneração hepática com reação proliferativa ductal, hiperplasia, proliferação dos ductos biliares e infiltração de heterófilos. Os metabólitos reativos da AFB₁ quando ligados a constituintes intracelulares, principalmente nos hepatócitos, prejudicam as defesas antioxidantes e induzem a danos genéticos (MARIN; TANARU, 2012).

A AFB₁ também pode induzir aumento da atividade das enzimas lisossomais no fígado e músculo esquelético de frangos. Sendo que esse fenômeno, associado a outros fatores, comprometem a integridade tecidual durante a intoxicação. Além das alterações ocorridas na bursa de Fabricius, verifica-se a degeneração do folículo associado ao epitélio, o que resulta na deficiência da resposta imune celular e humoral (CELIK et al., 2000).

Imunidade das Aves

O sistema imunológico é uma combinação de membranas com múltiplas características (pele, epitélio, muco), compostas por células e moléculas cuja função é reagir contra uma série de patógenos invasores ou até mesmo células neoplásicas. A função do sistema imune concentra-se principalmente na “resposta” dada à identificação e eliminação de agentes nocivos a saúde do hospedeiro. O sistema imunitário dos vertebrados é composto por dois elementos funcionais, o inato e o adquirido (KOGUT; KLASING, 2009).

A imunidade inata compreende uma rede de fagócitos (macrófagos/monócitos, células dendríticas e neutrófilos) e células citotóxicas, que possuem funções de vigilância, sendo a primeira defesa celular contra agentes invasores. Sendo assim, ela pode ser regulada por fatores exógenos, como a dieta (THOMPSON et al., 2010). Tais células possuem receptores

conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR) e os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002).

A imunidade adquirida envolve respostas imunes que são induzíveis e específicas a determinados antígenos, além de possuir memória. O contato inicial com o antígeno, através das células apresentadoras de antígeno (APC), leva à ativação dos linfócitos T e B, que são adaptáveis a respostas antigênicas (KOGUT; KLASING, 2009). Os receptores celulares são gerados por rearranjos de genes, resultando em repertório diverso de receptores antigênicos com várias especificidades de clones de linfócitos (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Após a eliminação da infecção, esses clones expandidos formam memória e fornecem uma resposta mais rápida para a segunda exposição ao mesmo antígeno (KOGUT; KLASING, 2009).

A imunidade adquirida é mediada por dois tipos diferentes de respostas dependendo do tipo de linfócito que responde principalmente para o antígeno: imunidade mediada por células (linfócitos T) e imunidade humoral (linfócitos B) (BENJAMINI et al., 2002). A imunidade humoral é caracterizada pela produção de anticorpos pelos linfócitos B em resposta ao antígeno extracelular reconhecido. A imunidade mediada por células é caracterizada pelo reconhecimento, através dos linfócitos T, de células hospedeiras infectadas ou transformadas (KORVER, 2006). Os linfócitos T desenvolvem-se no timo e os linfócitos B originam-se na medula óssea e diferenciam-se em células plasmáticas, na bursa de Fabrício. As células plasmáticas secretam glicoproteínas, que são os anticorpos que auxiliam os fagócitos (heterófilos e monócitos) no reconhecimento de antígenos (CARDOSO et al., 2003). Em adição, os linfócitos B, além da sua capacidade para segregar anticorpos, são capazes de assumir funções como a de apresentação de peptídeos antigênicos a linfócitos T (ZOUALI, 2013). Na maioria das espécies das aves, a percentagem de linfócitos é maior que qualquer outro elemento celular compreendendo entre 40 a 70% da contagem total (CARDOSO et al., 2003).

As células do sistema imunológico das aves, assim como as dos mamíferos, dividem-se de acordo com a estrutura nuclear. Os agranulócitos são constituídos por linfócitos, macrófagos, monócitos e trombócitos. Os granulócitos são constituídos por heterófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, e a morfologia destas células varia de acordo com as espécies aviárias (NORIEGA, 2000; MORGULIS, 2002).

Os monócitos, macrófagos, heterófilos e linfócitos constituem os componentes celulares das respostas imunológicas (MORGULIS, 2002), e os trombócitos (plaquetas) participam da cascata de coagulação sanguínea (FAIRBROTHER et al., 2004). Os monócitos possuem capacidade de fagocitar partículas estranhas e quando migram para os tecidos,

maturam e transformam-se em macrófagos (MORGULIS, 2002). Os macrófagos são os responsáveis pela defesa primária, contra os agentes infecciosos, auxiliando na regulação das respostas imunológica inata e adquirida (KLASING, 1998). Os heterófilos, neutrófilos em mamíferos, são responsáveis pela defesa primária contra bactérias. Outros granulócitos, como os eosinófilos e basófilos combatem parasitas e liberam mediadores solúveis de inflamação, respectivamente (FAIRBROTHER et al., 2004).

Múltiplos fatores influenciam no número de células presentes no sistema imunológico. Entre esses fatores estão as parasitoses, as micoses e as toxicoses. A leucopenia pode sugerir o decréscimo das funções imunológicas, entretanto, pode ocorrer aumento nas quantidades celulares circulantes mesmo na presença de imunossupressão. Mas a quantidade de leucócitos isoladamente de outros sinais clínicos, não é suficiente para indicar a presença de patologias, sendo necessárias outras informações fisiológicas e imunológicas para um diagnóstico correto (FAIRBROTHER et al., 2004).

Estrutura do Sistema Imunológico das aves

As aves não possuem linfonodos encapsulados, elas desenvolvem tecidos linfoides, que podem estar associados às mucosas, como no trato digestório as tonsilas cecais, as placas de Peyer, a bursa de Fabrício, divertículo de Meckel e as tonsilas pilóricas e esofagianas. Outro tecido linfoide, considerado o maior, é a glândula harderiana, que está associada ao olho das aves, localizada na órbita atrás dos olhos e possui infiltrado de linfócitos B e linfócitos T, principalmente CD4⁺ e TCRV β 1⁺. Durante a fase pós-natal os tecidos linfoides se desenvolvem e são maturados através de estímulo antigênico (OLÁH; VERVELDE, 2008).

Nas aves, órgãos como o timo e bursa de Fabrício, são sítios de maturação de linfócitos e o baço é o órgão responsável pelas reações imunológicas. No timo, os linfócitos T se desenvolvem e são selecionados para desenvolverem receptores CD4 e CD8 (FAIRBROTHER et al., 2004). Macrófagos e linfócitos T se comunicam através da liberação de citocinas, que são proteínas solúveis, tais como interferon ou prostaglandinas (BENJAMINI et al., 2002). Linfócitos B se desenvolvem na bursa de Fabrício, onde ocorre conversão ou rearranjo do gene para expressão de determinadas imunoglobulinas (WEILL et al., 1986). Neste mesmo órgão, ocorre a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos, que produzem, nas aves, três classes distintas de imunoglobulinas: IgM (anticorpo primário), IgY (resposta secundária) e IgA (anticorpos da mucosa) (OLÁH; VERVELDE, 2008).

Anticorpos são primariamente responsáveis pela neutralização viral, opsonização bacteriana ou de outras partículas para a facilitação da fagocitose, ligação a linfócitos T alvos ou ativação do sistema complemento para aumento da lise celular (FAIRBROTHER et al., 2004). Distúrbios no desenvolvimento dos órgãos linfoides e a supressão da função imunológica podem comprometer as respostas imunológicas, deixando o animal susceptível a contaminações e, conseqüentemente, a diversas patologias (CARDOSO et al., 2003).

Uma ferramenta muito útil para avaliação dos órgãos, disfunções imunológicas e metabólicas é através de sistemas *in vitro*, que abordam principalmente investigações toxicológicas. Essa área do conhecimento tem proporcionado a investigação toxicológica do efeito de fármacos e toxinas em cultura de células, melhorando consideravelmente a validação da ação tóxica de diversas substâncias e os mecanismos moleculares envolvidos no ambiente celular (ZUCCO et al., 2004). Os estudos *in vitro* vêm evoluindo e focando em fins citotóxicos, como investigações de hemato-, nefro- e hepatotoxicidade. Com o aprimoramento das investigações e facilidades para explicar diversos mecanismos celulares, esse sistema surge como uma alternativa para minimizar o uso de animais para estudos experimentais (WISE, 2002).

O cultivo de células está atraindo a atenção de pesquisadores, pela capacidade de desenvolver ensaios com rapidez, segurança e apreciável correlação com resultados *in vivo*. Também é um modelo para desenvolver análises envolvendo lesões ao DNA, potencial mutagênico e recombinogênico de qualquer substância. Além disso, é importante para o desenvolvimento de terapias celulares na medicina regenerativa envolvendo células tronco, engenharia de tecidos, virologia e aconselhamento genético (DE COPPI; BARTSCH, 2007; ZUCCO et al., 2004).

Imunomoduladores

Uma resposta imunológica eficiente é requerida para ter resistência às doenças infecciosas. A vacinação pode ser a medida mais eficaz para prevenir doenças de etiologia única. No entanto, quando uma variedade de agentes infecciosos e estressores ambientais induzem enfermidades, o uso de antibióticos pode ter vantagem substancial sobre a vacinação (GUO et al., 2003). Entretanto, a utilização de drogas antibacterianas, os antibióticos, pode resultar em resistência bacteriana e resíduos na carne das aves (CHAE et al., 2006). A interação envolvendo nutrição e imunidade pode ser um fator estratégico para se obter um

bom desempenho na indústria avícola. Componentes alimentares que afetam o sistema imunológico têm se tornado cada vez mais populares na promoção da saúde devido as suas propriedades imunomoduladoras, que podem regular funções fisiológicas e imunitárias (KOGUT; KLASING, 2009; RIEDER et al., 2013).

Imunomoduladores dietéticos, como as β -glucanas, estão atraindo a atenção como possíveis promotores de crescimento, aumentando a imunocompetência de animais de abate. Pesquisas demonstram a atividade imunomoduladora das β -glucanas em camundongos (SUZUKI et al., 1990), peixes (JENEY; ANDERSON, 1993), frangos de corte (CHAE et al., 2006) e humanos (KIM; YUN, 2006). Pela capacidade adsortiva que possuem, elas podem ser uma alternativa a reduzir a biodisponibilidade de micotoxinas, sendo uma estratégia disponível para atenuar o efeito dos metabólitos secundários (SMITH et al., 2006).

β -glucanas

As β -glucanas são polissacarídeos constituintes estruturais da parede celular de leveduras, fungos filamentosos e alguns cereais, que se diferenciam pelo tipo de ligação entre as unidades de glicose da cadeia principal e pelas ramificações que se conectam a essa cadeia (McINTOSH et al., 2005). Elas são capazes de induzir uma série de efeitos que modulam o sistema imune inato e adaptativo (THOMPSON et al., 2010). Quando testadas *in vitro*, as β -glucanas mostram atividade antimicrobiana (GORDON et al., 1998), antifúngica (HOHL et al., 2008) e antiparasitária (WILLIAMS et al., 1989). São conhecidas também por suas atividades antitumorais, anti-inflamatórias, hipocolesterolêmicas, hipoglicêmicas e antioxidantes (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

O interesse pelas propriedades biológicas das β -glucanas surgiu após a obtenção do zymosan, na década de 1950, quando elas foram reconhecidas como um dos componentes. O zymosan é um extrato insolúvel derivado da parede celular de *S. cerevisiae*, rico em proteínas, β -glucana, quitina, mananas e lipídeos, sendo a β -glucana o constituinte biologicamente ativo (DI CARLO; FIORE, 1958; YANG; MARSHALL, 2008). Foi atribuído ao zymosan propriedades imunoestimulantes, principalmente no sistema complemento e como sendo um potencializador durante a produção de anticorpos em ratos (CUTLER, 1960).

Uma importante fonte de β -glucanas é a parede celular de *S. cerevisiae*, um fungo leveduriforme de fermentação, amplamente empregado nas indústrias de panificação e cervejaria. Em *S. cerevisiae*, as β -glucanas são constituídas por um esqueleto linear central de

unidades de glicose ligadas na posição β (1-3), com cadeias laterais unidas em β (1-6), que ocorrem em diferentes intervalos e têm tamanhos variados. De acordo com estudos realizados por Kim e Yun (2006), as β -glucanas obtidas da parede celular de leveduras parecem ser mais efetivas do que aquelas obtidas de outras fontes como algas (*Laminaria* spp.), fungos zoospóricos (*Pythium aphanidermatum*) e bactérias (*Agrobacterium rhizogenes*) (THOMPSON et al., 2010).

Nos vertebrados, a resposta às β -glucanas inicia após a ingestão ou contato do sistema imune com receptores de reconhecimento presentes na superfície celular de macrófagos/monócitos, linfócitos, neutrófilos e células *natural killer* (NK), além da indução da expressão de diversas citocinas. Os receptores para β -glucanas também estão presentes nas células não imunes como as endoteliais, fibroblastos, do epitélio alveolar e de Langerhans (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; THANH HOA et al., 2011).

Como as β -glucanas não podem penetrar nas células, devido ao seu peso molecular, então a interação com o sistema imunológico ocorre através da ligação com os receptores celulares como o lactosilceramida, receptores *Toll-Like* (TRL) e principalmente dectina-1 (BROWN, 2005; YIANNIKOURIS et al., 2006). Após, as vias de sinalização intracelular recebem estímulos e culminam na ativação, translocação e ligação de proteínas nucleares imunomoduladoras (KUBALA et al., 2003). O mecanismo de ação está relacionado ao peso molecular, tipo de ligações glicosídicas, resíduos presentes, solubilidade em água, conformação espacial e grau de polimerização das β -glucanas (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

A atividade biológica da β -glucana baseia-se na sua longa permanência nos sistemas dos vertebrados em virtude da ausência da enzima β (1-3) glucanase que degrada a β -glucana e favorece a atividade imunoestimulante (SUDA et al., 1996; THOMPSON et al., 2010). A β -glucana é metabolizada principalmente por oxidação, resultando na solubilização e consequente atividade biológica (OHNO et al., 1999), ou pela secreção através de filtração glomerular (SUDA et al., 1996).

Outra característica importante das β -glucanas é atribuída à interação com as micotoxinas. De acordo com Yiannikouris e colaboradores (2006) as β -glucanas reduziram a biodisponibilidade de um complexo de micotoxinas (AFB₁, deoxinivalenol e patulina) no trato digestivo. A afinidade pelas micotoxinas está relacionada à forma como se ligam, exibindo maior afinidade pela AFB₁, em razão do encaixe da molécula de AFB₁ a estrutura das β -glucanas (Figura 3). A AFB₁ é presa dentro de uma única hélice da cadeia de β -glucana, deixando a cadeia ramificada como um local para novas ligações. Outra vantagem está

relacionada aos valores de energia com pequena variação, devido à interação de van der Waals permitindo várias posições de encaixe e uma fácil penetração e adsorção da AFB₁ na hélice da β -glucana (YIANNIKOURIS et al., 2006).

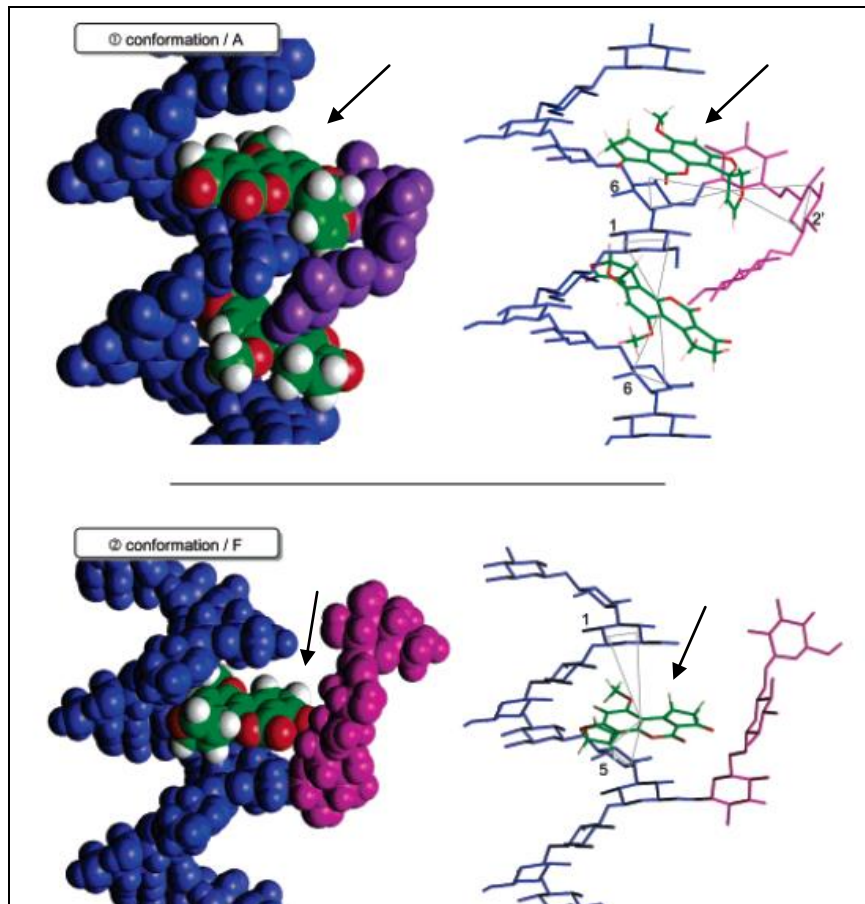


Figura 3 - Conformação da AFB₁ dentro da estrutura da β -glucana. Modelos de encaixe gerados por computador. As setas indicam a molécula de AFB₁. Fonte: Yiannikouris et al. (2006).

Diante disso e dos efeitos biológicos negativos da AFB₁ em aves é importante avaliar o mecanismo de ação citoprotetor de β -glucanas em aves expostas à AFB₁, como uma possível alternativa para evitar aflatoxicose e perdas agroeconômicas.

Estudos *in vitro* relacionando o efeito da AFB₁ sobre linfócitos de frangos de corte são escassos. Tendo em vista que as β -glucanas podem potencializar a resposta imunológica das aves e contribuir para uma melhor qualidade da carne de frango, é relevante o desenvolvimento de experimentos *in vitro* envolvendo a associação de ambas. O seu uso também pode influenciar na opinião pública que, cada vez mais, exige produtos alimentares

com menor risco à saúde humana, assim como nas medidas de melhoria das condições higiênico-sanitárias ambientais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito cito- e genoprotetor *in vitro* de β -glucanas sobre linfócitos de frangos (*Gallus gallus domesticus*) expostos à aflatoxina B₁

Objetivos específicos

- Verificar a susceptibilidade *in vitro* dos linfócitos a diferentes concentrações da AFB₁ sobre os parâmetros citotóxicos.

- Analisar a influência das diferentes concentrações de β -glucanas sobre a atividade celular dos linfócitos cultivados *in vitro* com e sem AFB₁.

- Determinar a concentração de β -glucanas que neutralizam a ação da AFB₁ sobre os linfócitos.

MANUSCRITO 1 – *In vitro* cytotoxicity of aflatoxin B₁ on lymphocytes of broiler chickens

Carine E. P. Zimmermann¹, Alencar K. Machado¹, Francine C. Cadoná², Jeandre A. S. Jaques², Karine B. Schlemmer¹, Cláudia Lautert³, Ivana B. M. Cruz^{1,2}, Régis A. Zanette¹, Daniela B. R. Leal², Janio M. Santurio^{1*}

***In vitro* cytotoxicity of aflatoxin B₁ on lymphocytes of broiler chickens**

Carine E. P. Zimmermann¹, Alencar K. Machado¹, Francine C. Cadoná², Jeandre A. S. Jaques², Karine B. Schlemmer¹, Cláudia Lautert³, Ivana B. M. Cruz^{1,2}, Régis A. Zanette¹, Daniela B. R. Leal², Janio M. Santurio^{1*}

¹Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

²Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

³Faculdade de Veterinária/Setor de Micologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

*** Corresponding author:**

Prof. Dr. Janio Morais Santurio (janio.santurio@gmail.com)

Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Phone/Fax: + 55 55 3220 8906

Abstract

This *in vitro* study focused on the cytotoxic effects of aflatoxin B₁ (AFB₁) on lymphocytes of broiler chickens incubated with the concentrations of 0, 0.1, 1, 10 and 20 µg/ml of AFB₁. Lymphocytes were separated by Ficoll-Histopaque density and cultured in 96 well-plates containing the AFB₁ concentrations in a 5% CO₂ atmosphere at 39°C. Thereafter, MTT, PicoGreen and reactive oxygen species assays were performed. Cell viability decreased in the presence of 10 µg/ml AFB₁ at 48 h ($p < 0.05$) and 10 and 20 µg/ml AFB₁ at 72 h ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively) when compared to the control (0 µg/ml). However, a dose-dependent increase in the cell-free DNA at 24 h at 1, 10 and 20 µg/ml ($p < 0.001$) was observed. ROS formation was significantly increased at 24 h at all concentrations ($p < 0.001$). The *in vitro* results demonstrate that AFB₁ is cytotoxic and cause biomolecular oxidative damage in lymphocytes of broiler chickens.

Keywords: Aflatoxin B₁; Lymphocytes; Broilers; MTT; PicoGreen; Reactive oxygen species.

1. Introduction

Aflatoxins are secondary metabolites of fungi of the genus *Aspergillus* that include the species *A. flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*, in particular (Kalpana et al., 2012; Hamid et al., 2013). The most common aflatoxins are B₁, B₂, G₁ and G₂, which naturally occur in several food products, and M₁ and M₂, which are found in milk, dairy products, eggs, meat and urine (Oliveira et al., 2000). The toxigenic potential of the aflatoxins is dependent on the species exposed, dose, duration of intake, age and nutritional state (Marai and Asker, 2008), and is directly associated with the rapid absorption by the gastrointestinal tract and immediate binding to serum proteins, such as albumin (Santurio, 2000). AFB₁ is recognized as one of the most potent known liver carcinogens, and causes genotoxic, immunotoxic and other adverse effects in many animal species, including poultry (Kalpana et al., 2012).

Despite its high mutagenic and teratogenic potential, the constant daily intake of small amounts of AFB₁ is responsible for the induction and modulation of diseases in humans and animals (Lewis et al., 1999). AFB₁ mainly affects the cell-mediated immunity (Williams et al., 2004), decreasing lymphocyte proliferation and cytokine production in experimental animals (Abbès et al., 2010). Moreover, AFB₁ is able to induce reactive oxygen species (ROS) generation, which may have a dual role, by acting as toxic bioproducts that alter the cellular function and viability, and also as key participants in the cellular regulation and signaling (Shen et al., 1996). The mode of carcinogenic action of AFB₁ requires metabolic activation by cytochrome (CYP) P-450, which is primarily responsible for the activation of AFB₁ to produce the ultimate carcinogen AFB₁-8,9-epoxide (Marai and Asker, 2008), which binds to DNA and RNA (Bbosa et al., 2013). DNA damage also occurs when ROS synthesis exceeds the ability of antioxidant defenses to eliminate them (Bischoff and Ramaiah, 2007).

The chronic exposure of animals to AFB₁ results in significant losses in the avian industry (Sur and Celik, 2003). Contamination by AFB₁ can negatively affect broiler chickens in a variety of ways, including reduced fitness, altered immune function (Yunus et al., 2011), decreased survival (Azzam and Gabal, 1998) and reduced humoral immune response to vaccines (Gabal and Azzam, 1998). Based on this context, we used the MTT, the PicoGreen fluorescence and the 2',7' dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) assays to investigate the effects of AFB₁ on lymphoid cells of broiler chickens cultivated *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

AFB₁ (C₁₇H₁₂O₆), RPMI-1640 medium, Ficoll-Histopaque density[®], HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), sodium bicarbonate, penicillin/streptomycin solution, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide) and DCFH-DA were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Fetal calf serum was obtained from Cultilab (Campinas, SP, BR) and Quant-iT™ PicoGreen[®] Reagent from Invitrogen (Eugene, UK).

2.2 Animals

Broiler chickens (*Gallus gallus domesticus*) from 38 to 42 days of age and weighing 2-2.5 kg were used in the experiments. The birds were obtained from a local slaughterhouse. The animals were submitted to electronarcosis, followed by a bleeding operation that is performed by sectioning the large vessels of the neck. All experimental procedures were conducted according to Normative Instruction N° 3, January 17th, 2000 (Regulation of Technical Methods for the Humane Slaughter of Animals) (MAPA, 2000).

2.3 AFB₁

AFB₁ (5 mg) was first dissolved in 99% ethanol (Mehrzhad et al., 2011). Further dilutions were made with RPMI 1640 complete medium containing 9.7 mM HEPES and 24 mM sodium bicarbonate, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 2.5 IU penicillin/streptomycin. AFB₁ was added to the medium containing the isolated lymphocytes at the final concentrations of 0.1, 1, 10 and 20 µg/ml with 0.5 % v/v of ethanol in the culture cell. Vehicle control cells were prepared in the same manner as AFB₁ treated samples, including the addition of the vehicle (0.5% ethanol), instead of AFB₁.

2.4 Peripheral blood mononuclear cells preparation

Lymphocyte-rich mononuclear cells of broiler chickens were isolated from blood collected with 7.2 mg dipotassium EDTA and separated on Ficoll-Histopaque density as

described by Böyum (1968) and Nathanson (1982), with the exception that lymphocytes were centrifuged at 1000 rpm for 5 min with culture medium to completely remove the platelets. Next, the pellet was suspended in culture medium and stored in a culture flask in a 5% CO₂ atmosphere at 39° C for 2 h to occur adhesion of monocytes to the surface of the bottle, which can eventually be among the lymphocytes (non adherent). After incubation, cell suspensions were transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. The supernatants were discarded, the dry pellets containing lymphocytes were suspended in 3 ml of culture medium, and the cell viability was measured using trypan blue dye (1:2). This protocol was performed within 2 h following blood collection.

Lymphocytes were suspended at a density of 0.7×10^5 cells/ml in RPMI 1640-enriched culture complete medium. Cells were seeded in triplicate in 96-well tissue culture plates under an atmosphere of 5% CO₂ at 39°C, and treated with increasing concentrations of AFB₁ (0, 0.1, 1, 10 and 20 µg/ml). The density of the cells that were seeded was equivalent to 75% confluence.

2.5 MTT assay

Cytotoxicity was evaluated by the MTT reduction assay, which is based on the cleavage of tetrazolium salts via the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase in metabolically active cells that yield a colored formazan product (Mosmann, 1983). Since the conversion takes place in living cells, the amount of formazan produced directly corresponds to the number of viable cells. Absorbance at 540 nm was measured by a microplate spectrophotometer. This assay was performed after 24, 48 and 72 h of AFB₁ exposure. All tests were performed in 96-well microplates in triplicate. The results were expressed as optical density (OD₅₄₀).

2.6 PicoGreen fluorescence assay

The PicoGreen fluorescence assay measures the presence of double-stranded (ds)DNA fragmentation, which is an indicative of cytotoxicity (Swarup et al., 2011). This assay was performed after 24, 48 and 72 h of exposure and followed the protocol supplied by the manufacturer (Quant It™, Invitrogen). PicoGreen dye was diluted to 1:200 with TE buffer (10 mM Tris–HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and incubated with each supernatant sample in the dark at room temperature in black 96-well microplates for 5 min. All fluorescence

measurements were recorded with a fluorimeter. Fluorescence emissions of PicoGreen alone (blank) and PicoGreen with supernatant were recorded at 520 nm using an excitation wavelength of 480 nm at 25°C. A standard curve was generated using the lambda DNA standard provided by the manufacturer. All calibration samples were assayed in quintuplicate. Baseline fluorescence was determined with a TE blank, the average of which was subtracted from the average fluorescence of the other samples. The results were expressed as fluorescence (nm).

2.7 Determination of intracellular ROS formation

Intracellular ROS concentrations were detected using the fluorescence probe DCFH-DA, which is a well-established compound that is used to detect and quantify free radicals, mainly intracellular hydrogen peroxide (H₂O₂). DCFH-DA is transported across the cell membrane and deacetylated by cytosolic esterases to form the non-fluorescent DCFH, which is trapped within the cells. DCFH is converted to fluorescent DCF through the action of peroxide rated by the presence of peroxidase (Halliwell and Whiteman, 2004; LeBel et al., 1992).

After each time point of exposure (24, 48 and 72 h), the cells were treated with DCFH-DA (10 µM) for 60 min at 37°C. Fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm. All tests were performed in 96-well microplates, in quintuplicate for each of the samples that were tested, and the results were expressed as fluorescence intensity (nm).

2.8 Statistical analysis

The data were normally distributed. Therefore, the data within each time point were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test. ANOVA followed by Tukey's test was used to calculate overall time effects. The results with $p < 0.05$ were considered significant. The data were pooled from three independent experiments, and the results were expressed as the mean and standard deviation.

3. Results

3.1 MTT assay

The lymphocyte viability of broiler chickens was assessed in the presence of AFB₁ using the MTT assay at 24, 48 and 72 h (Table 1). Compared with the control (0 µg/ml), this mycotoxin induced a significant decrease in cell viability at the concentration of 10 µg/ml ($p < 0.05$) at 48 h, and at the concentrations of 10 and 20 µg/ml ($p < 0.001$) at 72 h of incubation.

3.2 PicoGreen fluorescent assay

The effects of AFB₁ on free dsDNA in lymphocytes of broiler chickens were evaluated using the PicoGreen fluorescent assay (Fig. 1). An increase in dsDNA fragmentation was observed at the AFB₁ concentrations of 1, 10 and 20 µg/ml at 24 h ($p < 0.001$). No significant differences from the control group (0 µg/ml) were observed at 48 and 72 h.

3.3 DCFH-DA assay

Intracellular formation of ROS was examined using a fluorescence sensitive probe, through the DCFH-DA assay. When compared with the control (0 µg/ml), an increase in ROS concentrations was observed at 24 h of exposure to AFB₁ at the concentrations of 0.1, 1, 10 and 20 µg/ml ($p < 0.001$) (Fig. 2). At 48 and 72 h, the formation of ROS in cultures of broiler chicken lymphocytes tended to stabilize.

4. Discussion

The immune function is a complex process that comprises different elements of the immune system that must work together to elicit an effective immune response. Therefore, the ideal assessment of immune function requires a suite of tests that measure several different components. Studies have revealed that the immune system of birds is sensitive to environmental contaminants that can cause immunotoxicity (Yunus et al., 2011). With the purpose of better understanding the mycotoxin immunotoxicity in birds, we evaluated the *in*

in vitro cytotoxicity of a wide range of AFB₁ concentrations on peripheral lymphocytes of broiler chickens at different time points.

Firstly, we investigated the role of AFB₁ on lymphocyte viability by measuring the dehydrogenase enzyme activity. MTT assay is dependent on respiratory chain activity (Mosmann, 1983), which is responsible for energy production in the form of ATP and is necessary to maintain system organization and cellular functions. Our results with the MTT assay showed a strong correlation with the concentration and time of exposure to mycotoxin. The AFB₁ caused a significant reduction in the lymphocyte mitochondrial activity at 48 h and 72 h of incubation at the higher concentrations tested possibly by mitochondrial dysfunction (Bbosa et al., 2013). Corroborating this study, Taranu et al. (2010) performed experiments with human and porcine lymphocytes and also found a considerable decrease in cellular proliferation of lymphocytes at doses 1 and 10 µg/ml of AFB₁. Contradictory results were reported by Bernabucci et al. (2011), who found increased viability of bovine lymphocytes in the presence of 20 µg/ml of AFB₁ at days 2 and 7 of incubation.

According to Fairbrother et al. (2004), a reduced lymphoid cell count may suggest decreased immunological defense functions associated with those cells. On the other hand, circulating white blood cell counts can increase in response to infections, even in the presence of immunosuppression. This possibility represents a limitation of the MTT assay such that when bioactive compounds, such as AFB₁, are analyzed, cellular metabolism can be altered. Moreover the detection of cell-free DNA has emerged as an attractive tool in the early prognosis of several diseases. For this reason, we conducted the PicoGreen fluorescent assay to measure cell-free DNA circulating in cell supernatants, which would represent the extent of damage to cells.

We observed a dose-dependent increase in the dsDNA at 24 h of incubation. Our study is in agreement with studies of Guengerich et al. (1998), who reported that the highly reactive AFB₁-exo-8,9-epoxide is able to form adducts with DNA, which is directly proportional to the dose of AFB₁ (Choy, 1993). DNA release is able to either stimulate or inhibit immune cell activation, depending on concentration, sequence and context (Scaffidi et al., 2002). Moreover, viable cells produce only limited amounts of extracellular DNA and necrotic cells produce little or none, while apoptotic cell death can be a significant source of extracellular DNA (Choi et al., 2004). Considering the cell culture as a closed system, we hypothesized that apoptotic cell death was the source of dsDNA at 24 h, whereas immunostimulation can be related to interference with regulatory mechanisms that induce direct and indirect consequences on proliferation and differentiation of lymphocytes, as observed at 24 and 48 h

(MTT assay). Corroborate our findings of DNA damage the studies of Awad et al. (2012), who demonstrated that diets contaminated with the mycotoxin deoxynivalenol at moderated levels, in combination with low-protein feed, are able to induce lymphocyte DNA damage in chickens. Furthermore, Frankic et al. (2006) also demonstrated DNA fragmentation in chicken splenocytes treated with T-2 toxin and deoxynivalenol.

In the present study, ROS levels were enhanced in AFB₁-treated lymphocytes of broiler chickens at 24 h of exposure at all the evaluated concentrations. Mycotoxin interaction in the oxidative stress induction was shown to be an early effect, which might be related to the immunotoxicity of AFB₁. AFB₁ requires metabolic activation by CYP-450 to exert its cytotoxic and carcinogenic effects (Bbosa et al., 2013). The CYP-450 activity itself is associated with electron leakage, being also one of the important sources of intracellular ROS generation (Shen et al., 1996). Therefore, when the AFB₁ is bioactivated by this enzymatic complex, it is expected that such process increases the ROS production. Bischoff and Ramaiah (2007) described that the reactive species generated result in lipid peroxidation of membranes and oxidative modification of proteins and DNA in lesions. Increased ROS levels were also reported by Kouadio et al. (2005) in intestinal cell line Caco-2 human following exposure to the mycotoxins fumonisin B₁ (FB₁), deoxynevalenol and zearalenone, and in rat spleen mononuclear cells treated with AFB₁ and FB₁.

In conclusion, the results of this study evidenced that AFB₁ effects on broiler chicken immune system can be cytotoxic, depending on time and dose of exposure. However, it was demonstrated that AFB₁ is able to affect the oxidative status of broiler chicken lymphocytes, by increasing ROS levels, and to cause biomolecular oxidative damage, evidenced by the PicoGreen assay. This research contributes to an expanded use of immune function as a biological marker for contaminant effects in avian species, since immune cells such as lymphocytes can be important mediators of immunotoxic responses.

Conflicts of Interest Statement

There are no actual or potential conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. R. A. Z. acknowledges FAPERGS for the grant.

References

- Abbès, S., Ben Salah-Abbès, J., Abdel-Wahhab, M.A., Ouslati, R., 2010. Immunotoxicological and biochemical effects of aflatoxins in rats prevented by Tunisian montmorillonite with reference to HSCAS. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 32, 514-522.
- Awad, W.A., Ghareeb, K., Dadak, L., Gille, L., Staniek, K., Hess, M., Böhm, J., 2012. Genotoxic effects of deoxynivalenol in broiler chickens fed low-protein feeds. *Poult. Sci.* 3, 550-5.
- Azzam, A.H., Gabal, M.A., 1998. Aflatoxin and immunity in layer hens. *Avian Pathol.* 27, 570-7.
- Bbosa, G.S.; Kitya, D.; Lubega, A.; Ogwal-Okeng, J.; Anokbonggo, W.W.; Kyegombe, D.B., 2013. Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*, chapter 12.
- Bernabucci, U., Colavecchia, L., Danieli, P.P., Basirico, L., Lacetera, N., Nardone, A., Ronchi, B., 2011. Aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. in vitro.* 25, 684-691.
- Bischoff, K., Ramaiah, K., 2007. Liver toxicity, in: Gupta, R.C. (Eds), *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*. Elsevier Academic Press, New York, pp. 145-160.
- Böyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97, 77-89.
- Choi, J.J., Reich III, C.F., Pisetsky, D.S., 2004. Release of DNA from dead and dying lymphocyte and monocyte cell lines *in vitro*. *Scand. J. Immunol.* 60, 159-166.
- Choy, W.N., 1993. A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B₁ and its implications to quantitative cancer-risk assessment. *Mutat. Res.* 296, 181-198.
- Fairbrother, A., Smits, J., Grasman, K.A., 2004. Avian immunotoxicology. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* 7, 105-37.
- Frankic, T., Pajk, T., Rezar, V., Levart, A., Salobir, J., 2006. The role of dietary nucleotides in reduction of DNA damage induced by T-2 toxin and deoxynivalenol in chicken leukocytes. *Food Chem. Toxicol.* 44, 1838-44.
- Gabal, M.A., Azzam, A.H., 1998. Interaction of aflatoxin in the feed and immunization against selected infectious diseases in poultry. II. Effect on one-day-old layer chicks simultaneously vaccinated against Newcastle disease, infectious bronchitis and infectious bursal disease. *Avian Pathol.* 27, 290-295.
- Guengerich, F.P., Johnson, W.W., Shimada, T., Ueng, Y.F., Yamazaki, H., Langouët, S., 1998. Activation and detoxication of aflatoxin B₁. *Mutat. Res.* 402, 121-8.

- Halliwell, B., Whiteman, M., 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142, 231-255.
- Hamid, A.S., Tesfamariam, I.G., Zhang, Y., Zhang, Z.G., 2013. Aflatoxin B₁-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention, *Oncol. Lett.* 5, 1087-1092.
- Kalpana, S., Aggarwal, M., Srinivasa Rao, G., Malik, J.K., 2012. Effects of aflatoxin B₁ on tissue residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 121-6.
- Kouadio, J.H., Théophile, A.T., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D., Creppy, E.E., 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B₁ in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol.* 213, 56-65.
- LeBel, C., Ischiropoulos, H., Bondy, S., 1992. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227-231.
- Lewis, C., Smith, J., Anderson, J., Freshney, R., 1999. Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines *in vitro* via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay. *Mycopathologia.* 148, 97-102.
- Marai, I.F.M., Asker, A.A., 2008. Aflatoxins in rabbit production: hazards and control. *Trop Subtrop. Agroeco.* 1, 1-28.
- Mehrzad, J., Klein, G., Kamphuesd, J., Wolf, P., Grabowski, N., Schuberth, H.J., 2011. *In vitro* effects of very low levels of aflatoxin B₁ on free radicals production and bactericidal activity of bovine blood neutrophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141, 16-25.
- Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária – MAPA, 2000. Instrução Normativa nº 3 de 17 de janeiro de 2000. Aprovar o Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o Abate Humanitário de Animais de Açougue. Brasília, 2000.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
- Nathanson, R.M., 1982. Transformation of chicken lymphocytes stimulated by concanavalin A: response parameters. *Can. J. Comp. Med.*, 46, 57-59.
- Oliveira, C.A.F., Kobashigawa, E., Reis, T.A., Mestieri, L., Albuquerque, R., Corrêa, B., 2000. Aflatoxin B₁ residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Addit. Contam.* 17, 459-462.
- Santurio, J.M., 2000. Mycotoxins and mycotoxicosis in poultry. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2, 01-12.
- Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E., 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 418, 191-5.

- Shen, H., Shi, C., Shen, Y.I., Ong, C., 1996. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 139-146.
- Sur, E., Celik, I., 2003. Effects of aflatoxin B₁ on the development of the bursa of Fabricius and blood lymphocyte acid phosphatase of the chicken. *Br. Poult. Sci.* 44, 558-566.
- Swarup, V., Srivastava, A.K., Padma, M.V., Rajeswari, M.R., 2011. Quantification of circulating plasma DNA in Friedreich's ataxia and spinocerebellar ataxia types 2 and 12. *DNA Cell Biol.* 30, 389-394.
- Taranu, I., Marina, D., Burlacu, R., Pinton, P., Damian, V., Oswald, I.P., 2010. Comparative aspects of *in vitro* proliferation of human and porcine lymphocytes exposed to mycotoxins. *Arch. Anim. Nutr.* 64, 383-393.
- Williams, J., Phillips, T., Jolly, P., Stiles, J., Jolly, C., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am. J. Clin. Nutr.* 80, 1106–22.
- Yunus, A.W, Razzazi-Fazeli, E., Bohm, J., 2011. Aflatoxin B₁ in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. *Poult. Sci.* 90, 1683-89.

Figure 1

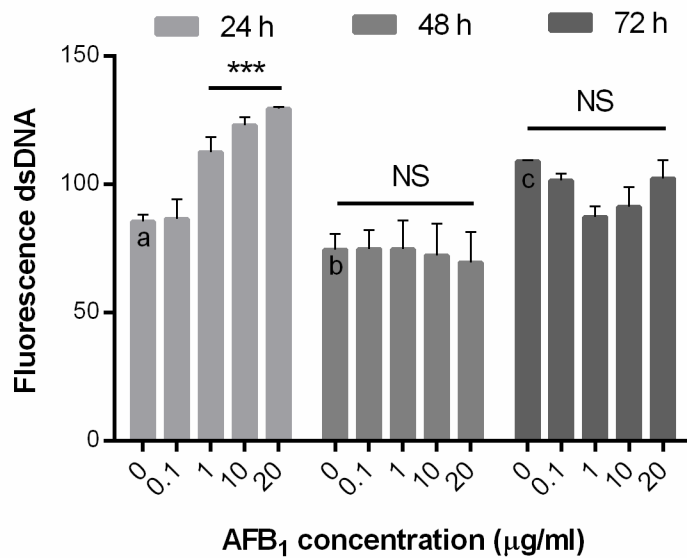


Fig. 1 Free dsDNA quantification. Lymphocytes of broiler chickens were exposed to increasing concentrations of AFB₁ at 24, 48 and 72 h and dsDNA levels were measured by the PicoGreen assay. Data are means \pm standard deviations. *** $p < 0.001$ compared to the control group (0 $\mu\text{g/ml}$ AFB₁) at each time point. Letters indicate significant differences among time points for the group without AFB₁ ($p < 0.05$).

Figure 2

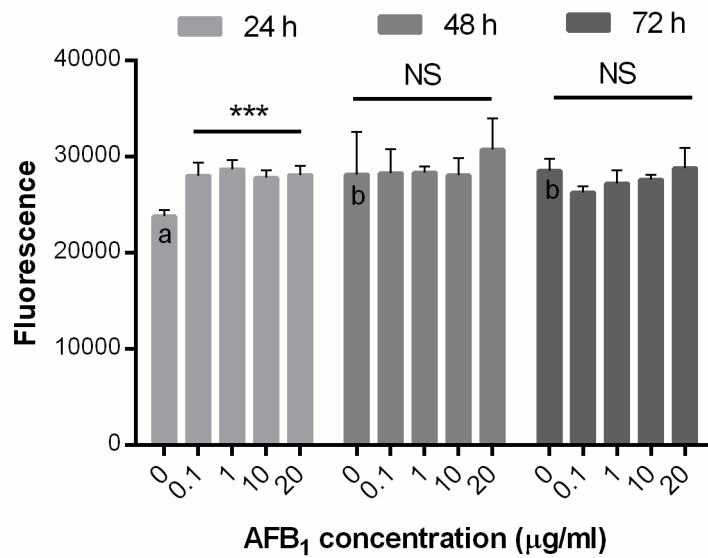


Fig. 2 Intracellular formation of ROS measured by the DCFH-DA assay. Lymphocytes of broiler chicken were exposed to increasing concentrations of AFB₁ and the fluorescence intensity was monitored at 24, 48 and 72 h of incubation. Data are means \pm standard deviations. *** $p < 0.001$ compared to the control group (0 $\mu\text{g/ml}$ AFB₁) at each time point. Letters indicate significant differences among time points for the group without AFB₁ ($p < 0.01$).

Table 1

Table 1. Cell viability of broiler chicken lymphocytes incubated for 24, 48 and 72 h at increasing concentrations of AFB₁. Data are expressed as means \pm standard deviations of the optical densities recorded at 540 nm.

Time	AFB ₁ concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	1	10	20
0 h	0.512 \pm 0.02	0.514 \pm 0.01	0.511 \pm 0.02	0.509 \pm 0.03	0.507 \pm 0.03
24 h	0.514 \pm 0.01	0.500 \pm 0.01	0.520 \pm 0.01	0.509 \pm 0.03	0.507 \pm 0.01
48 h	0.761 \pm 0.02	0.768 \pm 0.03	0.748 \pm 0.02	0.721 \pm 0.03*	0.785 \pm 0.02
72 h	0.760 \pm 0.01	0.776 \pm 0.01	0.782 \pm 0.02	0.696 \pm 0.04***	0.705 \pm 0.01**
<i>Time effect</i>	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$	$p < 0.001$

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, compared to control group (0 $\mu\text{g/ml}$ AFB₁) within the time of exposure.

**MANUSCRITO 2 – Genoprotective effect of β -glucans against Aflatoxin B₁-
induced DNA damage in broiler chicken lymphocytes**

Carine Eloise Prestes Zimmermann¹, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2}, Francine Carla Cadoná², Alencar Kolinski Machado¹, Charles Assmann³, Karine Bizzi Schlemmer¹, Régis A. Zanette¹, Daniela Bitencourt Rosa Leal², Janio Morais Santurio^{1*}

Genoprotective effect of β -glucans against Aflatoxin B₁-induced DNA damage in broiler chicken lymphocytes

Carine Eloise Prestes Zimmermann¹, Ivana Beatrice Mânica da Cruz^{1,2}, Francine Carla Cadoná², Alencar Kolinski Machado¹, Charles Assmann³, Karine Bizzi Schlemmer¹, Régis A. Zanette¹, Daniela Bitencourt Rosa Leal², Janio Morais Santurio^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria

²Programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

³Laboratório de Biogenômica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria

*** Corresponding author**

Prof. Dr. Janio Morais Santurio (janio.santurio@gmail.com)

Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. Phone/Fax: + 55 55 3220 8906

Abstract

The polysaccharide β -glucan presents beneficial effects on the immune system, although the mechanisms of the immunomodulatory effect remain poorly understood. To contribute to the elucidation of the potential genoprotective effect of β -glucans, we exposed broiler chicken lymphocytes to increasing concentrations of aflatoxin B₁ (AFB₁) and/or β -glucans. AFB₁ significantly decreased cell viability at the concentrations of 10 and 20 μ g/ml at 72 h of incubation ($p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). Moreover, the AFB₁ concentrations of 1, 10 and 20 μ g/ml increased DNA fragmentation levels at 24 h ($p < 0.001$). Conversely, lymphocyte death was prevented by β -glucans at the concentrations of 1 and 10%, indicating a cytoprotective effect ($p < 0.001$). Reactive oxygen species levels were increased in the cells treated with AFB₁ ($p < 0.001$) and 10% β -glucans at 24, 48 and 72 h of incubation ($p < 0.001$). β -glucans at 10% in combination with AFB₁ potentiated the toxic effect of mycotoxins. DNA damage increased approximately 2.3 fold in AFB₁-treated lymphocytes when compared to control group. β -glucans at 1% was able to fully revert the AFB₁-induced lymphocyte DNA damage, indicating a genoprotective effect and maintaining DNA integrity. In conclusion, β -glucans showed *in vitro* dose-dependent genoprotective effect in broiler chicken lymphocytes exposed to AFB₁.

Keywords: β -glucan, aflatoxin B₁, genotoxicity, cytotoxicity, oxidative stress.

1. Introduction

Mycotoxins such as aflatoxin B₁ (AFB₁) produced by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius* are commonly found in grains and other foods and feedstuffs, causing health damage and economic losses [1,2]. AFB₁ is responsible to losses in animal productivity, especially in broiler chickens [3], causing fatty liver and kidney disorders, leg and bone problems, alterations in pigmentation (carcasses, egg yolk), reduced hatchability, smaller eggs and immunity dysfunctions that lead to vaccine failure and lower resistance to diseases [4].

Chronic exposure to AFB₁ is highly mutagenic and associated with human hepatocellular carcinoma [3]. This risk is related to AFB₁ metabolism by cytochrome (CYP) P-450 enzymes that generates toxic metabolites such as AFB₁-8,9-exo-epoxide [5], a genotoxic hepatocarcinogen that presumptively causes cancer by inducing DNA adducts, leading to genetic changes in the target cells and oxidative damage [2,6].

Growth-promoting antibiotics, commonly used in poultry production, have been replaced by prebiotic or probiotic agents because of the European ban on the use of antibiotics in animal feed. Therefore, there has been an urge to the development of alternative methods to promote animal health [7,8]. Studies have demonstrated that dietary immunomodulators such as β -glucans show beneficial results in a wide variety of animal species [9,10]. The immunostimulant and immunomodulatory effects of β -glucan polysaccharides result in the regeneration of the host's ability to resist life-threatening opportunistic infections [8]. The immunomodulatory process initiates when the β -glucan binds to cell surface receptors of macrophages, lymphocytes and neutrophils [10,11]. β -glucan activates B-lymphocytes and macrophages through dectin-1, CR3, lactosylceramide, scavenger receptors and Toll-like receptors [12,13], modulating the immune system and inducing the production of cytokines [14]. In broilers, β -glucan has been shown to be an excellent adjuvant for the avian influenza H5 subtype vaccine, enhancing the vaccine immunogenicity [12].

Therefore, the present study was designed to examine the *in vitro* cyto- genoprotective of β -glucans effects on broiler chicken lymphocytes exposed to different concentrations of AFB₁.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

AFB₁ (C₁₇H₁₂O₆), RPM 1640 medium, Ficoll-Histopaque density[®], HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), sodium bicarbonate, penicillin/streptomycin solution, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide), DCFH-DA (2',7' dichlorofluorescein diacetate) and β-glucana (25 mg) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Fetal calf serum was obtained from Cultilab (Campinas, SP, BR) and Quant-iT™ PicoGreen[®] Reagent from Invitrogen (Eugene, UK).

2.2. Broiler chicken lymphocyte culture

Lymphocytes were obtained from adult broiler chicken (38-42 days, 2-2.5kg) from a local slaughterhouse. All experimental procedures were conducted according to Normative Instruction N° 3, January 17th, 2000 (Regulation of Technical Methods for the Humane Slaughter of Animals) [15]. The animals were submitted to electronarcosis, followed by a bleeding operation that is performed by sectioning the large vessels of the neck. The blood was collected in sterile culture tubes containing dipotassium EDTA as anticoagulant.

Broiler chicken lymphocyte culture was performed as described by Nathanson [16], with some modifications. Blood mononuclear cells were isolated from samples using Ficoll-Histopaque density [17]. These cells were centrifuged at 1000 rpm for 5 min with culture medium to completely remove the platelets. Next, the pellet was suspended in culture medium and stored in a culture flask in a 5% CO₂ atmosphere at 39°C for 2 h to occur adhesion of monocytes to the surface of the bottle, which can eventually be among the lymphocytes (non-adherent). After incubation, cell suspensions were transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 1500 rpm for 10 minutes. The pellets containing lymphocytes were suspended in 3 ml of culture medium, and the cell viability was measured using trypan blue dye (1:2). Lymphocytes were suspended at a density of 0.7×10^5 cells/ml in RPMI 1640-enriched culture complete medium. Cells were seeded in triplicate in 96-well tissue culture plates under an atmosphere of 5% CO₂ at 39°C.

2.3. AFB₁ and β-glucan treatment conditions

AFB₁ (5 mg) was dissolved in 99% ethanol and β-glucans (25 mg) was dissolved in saline 0.9% and subjected to sonic energy via a 19-mm probe using a 300-V/T Sonic Dismembrator for 30 minutes, alternating with water bath at 80°C for 10 minutes [18,19].

Further dilutions were made in RPMI 1640 medium containing 9.7 mM HEPES and 24 mM sodium bicarbonate and supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 2.5 IU penicillin/streptomycin. AFB₁ was added to the medium containing the isolated lymphocytes at the final concentrations of 0.1, 1, 10 and 20 µg/ml with 0.5 % v/v of ethanol in the culture cell. β-glucan was added to the medium at the concentrations of 0.1, 1 and 10% v/v. The lymphocyte samples were exposed to the concentrations of AFB₁ and/or of β-glucans. The density of the cells that were seeded was equivalent to 75% confluence. Control group cells were prepared in the same manner as treated samples, including the addition of the vehicle (0.5% ethanol) but in absence of AFB₁ and β-glucans.

Of note, the potential beneficial effects of β-glucans on broiler chicken lymphocytes were evaluated by the MTT, PicoGreen, DCFH-DA and Comet assays using the highest AFB₁ concentration (20 µg/ml).

2.4. MTT viability assay

The MTT bioassay was performed to monitor cell viability and to analyze the functional and proliferative characteristics of lymphocytes. The MTT assay is based on the cleavage of tetrazolium salts via the activity of mitochondrial succinate dehydrogenase in metabolically active cells that yield a colored formazan product [20]. Since the conversion takes place in living cells, the amount of formazan produced directly corresponds to the number of viable cells. Absorbance at 540 nm was measured by a microplate spectrophotometer. The cytotoxic effect of AFB₁ was evaluated after 24, 48 and 72 h of incubation, and the protective effect of the β-glucan concentrations of 0.1, 1 and 10% was evaluated in lymphocytes exposed to the highest AFB₁ concentration (20 µg/ml) at 72 h. This assay was performed in 96-well microplates, in triplicate. The results were expressed as the percentage of the absorbance values of control group (0 µg/ml AFB₁ and 0 % β-glucans) to absorbance of treated groups.

2.5. Double-stranded DNA (dsDNA) levels cytotoxicity assay

The PicoGreen fluorescence assay measures the presence of dsDNA fragmentation, which is also an indicative of cytotoxicity [21]. This assay was performed only after 24 h of exposure and followed the protocol supplied by the manufacturer (Quant It™, Invitrogen). PicoGreen dye was diluted to 1:200 with TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5)

and incubated with each supernatant sample in black 96-well microplates in the dark at room temperature for 5 minutes. All fluorescence measurements were recorded with a fluorimeter. Fluorescence emissions of PicoGreen alone (blank) and PicoGreen with supernatant were recorded at 520 nm using an excitation wavelength of 480 nm at 25°C. A standard curve was generated using the lambda DNA standard provided by the manufacturer. All calibration samples were assayed in quintuplicate. Baseline fluorescence was determined with a TE blank, the average of which was subtracted from the average fluorescence of the other samples. The results were expressed as % of control fluorescence using the following equation: % of control = [(sample fluorescence x 100)/ mean of control sample fluorescence].

2.6. Determination of intracellular reactive oxygen species (ROS) using 2',7' dichlorofluorescein diacetate

The effects of AFB₁ exposition with and without β-glucan supplementation on ROS levels of broiler chicken lymphocytes cultures were determined using the non-fluorescent cell permeating compound DCFH-DA. In this technique, the DCFH-DA is hydrolyzed by intracellular esterases to DCFH, which is trapped within the cell. This non-fluorescent molecule is then oxidized to fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by cellular oxidants. After each time point of exposure (24, 48 and 72 h), the cells were treated with DCFDA (10 μM) for 60 minutes at 37°C. The fluorescence was measured at an excitation of 488 nm and an emission of 525 nm (SpectraMax M2/M2e Multi-mode Plate Reader, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA). All tests were performed in triplicate for each of the samples tested [22].

2.5. DNA comet alkaline assay

The comet assay was used to test the genoprotective effect of β-glucans supplementation on broiler chicken lymphocytes exposed to different AFB₁ concentrations at 72 h incubation. The assay was performed as described by Singh et al. [23]. Briefly, 100 cells (50 cells from each of the two replicate slides) were selected and analyzed. Cells were visually scored according to tail length and received scores from 0 (no migration) to 4 (maximal migration). Therefore, the damage index for cells ranged from 0 (all cells with no migration) to 400 (all cells with maximal migration). The slides were analyzed under blind conditions by at least two different researchers.

2.6. Statistical analysis

The data were normally distributed. Therefore, differences among groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's post hoc test. The results with $p < 0.05$ were considered significant. The data were pooled from three independent experiments, and the results were expressed as the mean and standard error of the mean.

3. Results

3.1. Effects of AFB₁ and β -glucan on cell viability

Initially, the cytotoxic effect of different AFB₁ concentrations on broiler chicken lymphocytes at 24, 48 and 72 h of exposition was evaluated by the MTT assay. AFB₁ decreased lymphocyte viability ($p < 0.001$) at 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ at 72 h of exposition (Fig. 1A). Conversely, the percentage of viable lymphocytes significantly increased when the concentrations of 0.1, 1 and 10% of β -glucans were added to the culture medium. A similar result was obtained when 1 and 10% β -glucans were added to lymphocytes exposed to 20 $\mu\text{g/mL}$ AFB₁, whereas the percentage of viable cells was similar to the control group in the concentration of 0.1% (Fig. 1B).

The second analysis was performed to evaluate the lymphocyte DNA damage caused by *in vitro* exposure to increasing concentrations of AFB₁ and the potential cytoprotective effect of β -glucans at 24 h of incubation. The AFB₁ concentrations of 1, 10 and 20 $\mu\text{g/ml}$ increased dsDNA levels when compared to the control (Fig. 2A), which indicated augmented cellular mortality ($p < 0.001$). However, decreased dsDNA concentrations in the culture medium supernatant were observed in cells treated with β -glucans ($p < 0.001$). Moreover, the concentrations of 1 and 10% of β -glucans were able to attenuate the DNA damage caused by 20 $\mu\text{g/mL}$ of AFB₁ ($p < 0.05$) (Fig. 2B), highlighting the cytoprotective effect of β -glucans.

3.2. Intracellular ROS formation

The ability of AFB₁ and β -glucan to affect the oxidative metabolism of broiler chicken lymphocytes was evaluated by the DCFH-DA assay. Table 1 shows that ROS levels were positively or negatively influenced by different AFB₁ and β -glucans concentrations when

compared to the control group. At 24 h of incubation, ROS levels were significantly increased in the presence of 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AFB_1 and significantly decreased in the presence of 0.1 and 1% β -glucans. No differences from the control group were observed at 48 and 72 h of incubation for these groups. Nonetheless, the concentration of 10% of β -glucans increased ROS levels at all time points evaluated ($p < 0.05$), especially in AFB_1 -treated lymphocytes ($p < 0.01$). Therefore, the concentrations of 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of AFB_1 and of 10% of β -glucan had an additive effect on ROS formation in broiler chicken lymphocytes.

3.3. DNA damage

The genoprotective effect of β -glucans treatment in broiler chicken lymphocytes exposed to 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of AFB_1 was also evaluated. Fig. 3 shows a representative picture of the DNA tail damage observed in our study. After 72 h of incubation, DNA damage increased approximately 2.3 fold in AFB_1 -treated lymphocytes when compared to the control group (Fig. 4). A slight increase in lymphocyte DNA damage was observed in the lowest β -glucan concentration (0.1%) with or without AFB_1 , when compared to control group. DNA damage levels in lymphocytes treated with 1% of β -glucans were statistically similar to the observed in the control group, showing genoprotection. When 10% β -glucan was used, the levels were decreased in the absence of AFB_1 ($p < 0.001$) and increased in the presence of AFB_1 in relation to the control group ($p < 0.05$).

4. Discussion

The present study described the cyto-genoprotective effects of β -glucans against AFB_1 toxicity *in vitro* in broiler chicken lymphocytes. AFB_1 is a recognized molecule that causes high genotoxicity and increases the risk of chronic diseases such as cancer in humans and animals because of its potent mutagen and carcinogen properties [24]. The MTT assay demonstrated cytotoxic effect at the highest AFB_1 concentrations in broiler chicken lymphocytes, evidenced by decreased cell viability from 48 and 72 h of incubation onwards. However, release of cell-free DNA into the medium was already observed at 24 h of incubation. Our study corroborates findings by Singh et al. [25], who demonstrated that AFB_1 has cytotoxic effects on the growth of H4IIE cells in rats and induces the formation of micronuclei (cytogenetic assay) in a concentration-dependent manner. Miranda et al. [26] also found DNA damage caused by AFB_1 in guinea pig lymphocytes, whereas Galli-Bennour et al.

[27] showed a significant reduction in cell viability and an increase in DNA fragmentation in Vero cell line.

ROS levels increased when 20 $\mu\text{g/ml}$ of AFB₁ was added to culture medium containing broiler chicken lymphocytes at 24 h of incubation. Mary et al. [2] found involvement of ROS in AFB₁-induced cell damage in mononuclear cells from rat spleen. The toxicity of AFB₁ may involve the generation of intracellular ROS during the biotransformation by CYP-450 [28]. Indeed, the comet assay showed that AFB₁ is genotoxic in broiler chicken lymphocytes *in vitro*. DNA adducts disrupt the normal working process of the cell leading to a loss of control over cellular growth and division [6].

Due to the potential damage that AFB₁ can cause to DNA, which can lead to pathologies, antigenotoxic strategies could be used to prevent or attenuate the deleterious effects of AFB₁. Therefore, considering that a functional immune system is a requirement of a healthy life in modern animal production systems, the interaction involving nutrition and immunity is a strategic factor to obtain a high quality performance in the poultry industry [8,9]. In this context, we evaluated the influence of β -glucans, from *Saccharomyces cerevisiae*, on cell culture of broiler chicken lymphocytes. All concentrations of β -glucans stimulated cell proliferation and did not induce dsDNA release in the absence of AFB₁. When lymphocytes were challenged with 20 $\mu\text{g/ml}$ of AFB₁, the concentrations of 1 and 10% of β -glucans showed cytoprotective effect by decreasing AFB₁-induced dsDNA release in the culture medium. The cytoprotection can be a consequence of the action of β -glucans in the cell cycle, assisting in repair or blocking mutations. Corroborating this study, Slaménová et al. [29] reported protective effects of β -glucans against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells.

AFB₁ is commonly associated to oxidative damage and numerous compounds and extracts have been reported to reduce the oxidative stress induced by this molecule [30,31]. Evidences have shown that β -glucans exert a positive influence on repair, metabolism and detoxification cellular processes [32]. Nonetheless, the immunomodulatory mechanisms of β -glucans remain poorly understood [33]. In our study, the highest β -glucans concentration (10%) showed pro-oxidant effects, mainly when combined with AFB₁. The increase in ROS formation caused by the highest β -glucans concentration alone and the potentiating effect observed with the highest AFB₁ concentration should be further evaluated, mainly because only one oxidative parameter (release of free H₂O₂ into the medium) was analyzed in our study. Moreover, Yang and Marshall [34] showed that murine mast cells cultured with zymosan, which is rich in β -glucan, generate intracellular ROS in response to zymosan

activation of dectin-1 receptors. This leads us to suggest that β -glucans-induced ROS formation is in response to lymphocyte activation in a time-, dose-dependent fashion.

Based on the AFB₁-induced cytotoxicity response, the cells were subjected to the comet assay, which determines the extent of DNA damage by measuring the tail moment. The assay showed that β -glucans at 1% can improve lymphocyte DNA damage and it was able to fully revert the AFB₁-induced genotoxicity in lymphocytes. The protective effect was attributed to the β -glucan adsorbent capacity, particularly due to a chemical interaction with AFB₁, as well as by virtue of interacting with DNA repair pathways. By performing studies using probiotics in mice, Madrigal-Santillán et al. [35] showed a 70% reduction in the frequency of micronuclei after six weeks of treatment with *S. cerevisiae* (0.3% suspension of viable organisms). Nonetheless, whether the 0.1% concentration was insufficient to protect the cells, β -glucans at 10% potentiated ROS formation and, consequently, increased DNA damage in the presence of AFB₁. Interestingly, β -glucans at 10% alone was genoprotective, leading us to conclude that the genoprotective effect induced by β -glucan is not only dose-dependent, but also dependent on the presence of xenobiotic compounds.

In conclusion, β -glucans presented *in vitro* cyto- and genoprotective effects on broiler chicken lymphocytes exposed to AFB₁. Hence, β -glucan between concentrations of 1 and 10% would be helpful to maintain DNA integrity. However, it is not yet known what are the implications to the immune system of the intracellular ROS generation induced by the 10% β -glucan concentration, and further studies evaluating other oxidative stress biomarkers are desired. Our study paved the way for *in vivo* trials using β -glucan supplementation in the diet of broiler chickens.

Conflicts of Interest Statement

There are no actual or potential conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil.

References

- [1] S. Kalpana, M. Aggarwal, G. Srinivasa Rao, J.K. Malik, Effects of aflatoxin B₁ on tissue residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in broiler chicken, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33 (2012) 121-6.
- [2] V.S. Mary, M.G. Theumer, S.L. Arias, H.R. Rubinstein, Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in rat spleen mononuclear cells, *Toxicol.* 302 (2012) 299-307.
- [3] A.S. Hamid, I.G. Tesfamariam, Y. Zhang, Z.G. Zhang, Aflatoxin B₁-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention, *Oncol. Lett.* 5 (2013) 1087-1092.
- [4] O.O.M. Iheshiolor, B.O. Esonu, O.K. Chuwuka, A.A Omede, I.C. Okoli, I.P. Ogbuewu, Effects of mycotoxins in animal nutrition: a review, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 5 (2011) 19-33.
- [5] D.E. Marin, I. Taranu, Overview on aflatoxins and oxidative stress, *Toxin Rev. Early Online* (2012) 1-12.
- [6] R.J. Verma, Aflatoxin cause DNA damage, *Int. J. Hum. Genet.* 4 (2004) 231-236.
- [7] I. Phillips, Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health, *Int. J. Antimicrob. Agents* 30 (2007) 101-107.
- [8] A. Rieder, G. Stine, L.A. Finn, W. Bjørge, K. Svein Olav, K. Svein Halvor, Generic tools to assess genuine carbohydrate specific effects on *in vitro* immune modulation exemplified by β -glucans, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 2075-2083.
- [9] B.J. Chae, J.D Lohakare, W.K. Moon, S.L. Lee, Y.H. Park, T.W. Hahn, Effects of supplementation of beta-glucan on the growth performance and immunity in broilers, *Res. Vet. Sci.* 80 (2006) 291-298.

- [10] Y. Guo, R.A. Ali, M.A. Qureshi, The influence of β -glucan on immune responses in broiler chicks, *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 25 (2003) 461-472.
- [11] J. Chen, R. Seviour, Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans, *Mycol. Res.* 111 (2007) 635-52.
- [12] L. Thanh Hoa, L. Tran Binh, D. Thanh Huong Thi, Q. Dong Van, L. Kim Xuyen Thi, P. Viet Cuong, A. Takeshi, The adjuvant effect of sophy β -glucan to the antibody response in poultry immunized by the avian influenza a h5n1 and H5N2 vaccines, *J. Microbiol. Biotechnol. Res.* 21 (2011) 405.
- [13] P.R. Taylor, G.D. Brown, D.M., D.M. Reid, J.A. Willment, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, S.Y.C. Wong, The β -glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages, *J. Immunol.* 169 (2002) 3876-3882.
- [14] Y. Cheng, D. Lee, C. Wen, C. Weng, Effects of β -glucan supplementation on lymphocyte proliferation, macrophage chemotaxis and specific immune responses in broilers, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 17 (2004) 1145-1149.
- [15] Ministério da Agricultura do Abastecimento e da Reforma Agrária – MAPA, Instrução Normativa nº 3 de 17 de janeiro de 2000. Aprovar o Regulamento Técnico de Métodos de Insensibilização para o Abate Humanitário de Animais de Açougue. Brasília, 2000.
- [16] R.M. Nathanson, Transformation of chicken lymphocytes stimulated by concanavalin A: response parameters, *Can. J. Comp. Med.* 46 (1982) 57-59.
- [17] A. Böyum, Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97 (1968) 77-89.
- [18] J. Mehrzad, G. Klein, J. Kamphuesd, P. Wolf, N. Grabowski, H.J. Schuberth, *In vitro* effects of very low levels of aflatoxin B1 on free radicals production and bactericidal activity of bovine blood neutrophils, *Vet. Immunol. Immunopathol.* 141 (2011) 16-25.

- [19] M.L.C. Gonzaga, D. P. Bezerra, A.P.N.N. Alves, N. M. N. Alencar, R.O. Mesquita, M.W. Lima, S. A. Soares, C. Pessoa, M. O. Moraes, L.V. Costa-Lotufo, *In vivo* growth-inhibition of Sarcoma 180 by an α -(1 \rightarrow 4)-glucan β -(1 \rightarrow 6)-glucan-protein complex polysaccharide obtained from *Agaricus blazei* Murill, *J. Nat. Med.* 63 (2009) 32-40.
- [20] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55-63.
- [21] V. Swarup, A.K. Srivastava, M.V. Padma, M.R. Rajeswari, Quantification of circulating plasma DNA in Friedreich's ataxia and spinocerebellar ataxia types 2 and 12, *DNA Cell Biol.* 30 (2011) 389-394.
- [22] C.P. LeBel, S.F. Ali, S.C. Bondy, Deferoxamine inhibits methyl mercury-induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112 (1992) 161-165.
- [23] N. Singh, M. McCoy, R. Tice, E. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1998) 184-191.
- [24] K. Gross-Steinmeyer, D.L. Eaton, Review: Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B₁, *Toxicol.* 299 (2012) 69-79.
- [25] J., Singh, R.K. Reen, F.J. Wiebel, Piperine, a major ingredient of black and long peppers, protects against AFB₁-induced cytotoxicity and micronuclei formation in H4IIEC3 rat hepatoma cells, *Cancer Lett.* 86 (1994) 195–200.
- [26] D. Miranda, D. Arçari, M. Ladeira, M. Calori-Domingues, A. Romero, D. Salvadori, M. Ribeiro, Analysis of DNA damage induced by aflatoxin B₁ in Dunkin-Hartley guinea pigs, *Mycopathologia* 163 (2007) 275-280.
- [27] E.E. Galli-Bennour, B. Kouidhi, A. Bouslimi, S. Abid-Essefi, W. Hassen, H. Bacha, Cytotoxicity and genotoxicity induced by aflatoxin B₁, ochratoxin A, and their combination in cultured Vero cells, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 24 (2010) 42-50.

- [28] E. Madrigal-Santillán, J.A. Morales-González, N. Vargas-Mendoza, P. Reyes-Ramírez, S. Cruz-Jaime, T. Sumaya-Martínez, R. Pérez-Pastén, E. Madrigal-Bujaidar, Review: Antigenotoxic studies of different substances to reduce the dna damage induced by aflatoxin B₁ and ochratoxin A, *Toxins* 2 (2010) 738-757.
- [29] D. Slamenová, J. Lábaj, L. Krizková, G. Kogan, J. Sandula, N. Bresgen, P. Eckl, Protective effects of fungal (1→3)-beta-D-glucan derivatives against oxidative DNA lesions in V79 hamster lung cells, *Cancer Lett.* 20 (2003) 153-60.
- [30] O. Gursoy-Yuzugullu, H. Yuzugullu, M. Yilmaz, M. Ozturk, Aflatoxin genotoxicity is associated with a defective DNA damage response bypassing p53 activation, *Liver Int.* (2011) 561-571.
- [31] L.A. Corcuera, S. Amézqueta, L. Arbillaga, A. Vettorazzi, S. Touriño, J.L. Torres, A. López de Cerain, A polyphenol-enriched cocoa extract reduces free radicals produced by mycotoxins, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 989-995.
- [32] E.A. Murphy, J.M. Davis, M.D. Carmichael, Efeitos moduladores imunes de β- glucana, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 13 (2010) 656-61.
- [33] D. Akramienė, A. Kondrotas, J. Didžiapetrienė, E. Kėvelaitis, Effects of β-glucans on the immune system, *Medicina (Kaunas)* 43 (2007) 597-606.
- [34] Z. Yang, J.S. Marshall, Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation, *Immunobiology* 214 (2009) 321–330.
- [35] E. Madrigal-Santillán, E. Madrigal-Bujaidar, R. Márquez-Márquez, A. Reyes, Antigenotoxic effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the damage produced in mice fed with aflatoxin B₁ contaminated corn. *Food Chem. Toxicol.* 44 (2006) 2058-2063.

Figure 1

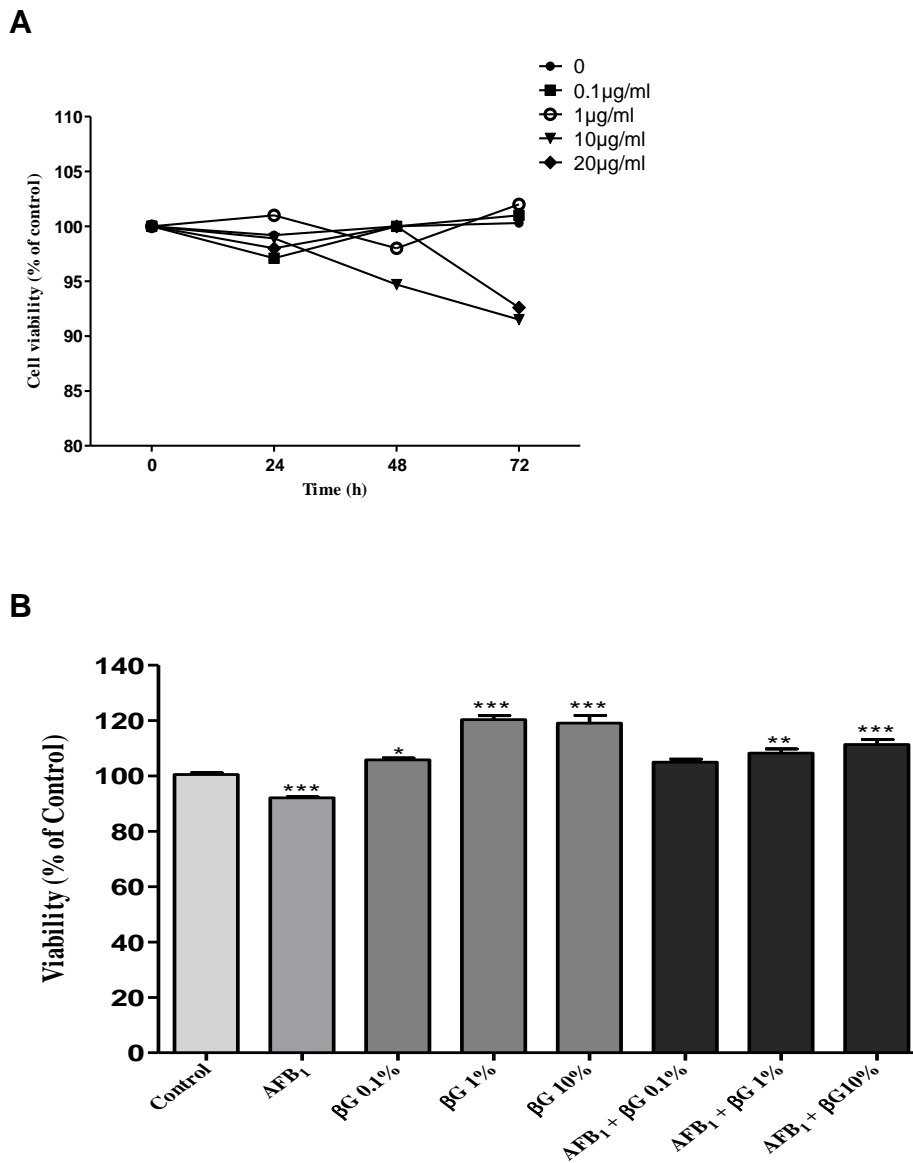
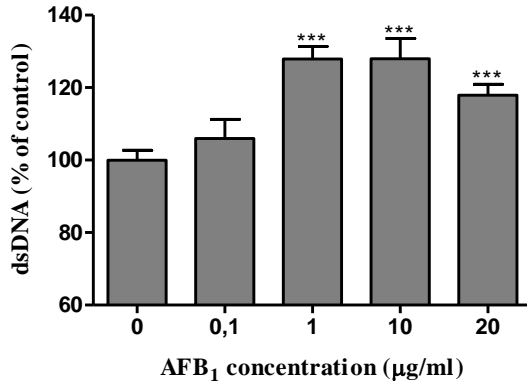


Fig. 1. Cell viability in broiler chicken lymphocytes culture. (A) The MTT assay measured the percentage of mitochondrial lymphocytes activity after exposure to increasing concentrations of AFB₁ at 24, 48 and 72 h of incubation. (B) Cultures containing increasing concentrations of β -glucan (β G) and/or 20 μ g/ml of AFB₁ were incubated for 4 h with MTT after 72 h of incubation under an atmosphere of 5% CO₂ at 39°C. Values are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared to the control group (0% β -glucan and 0 μ g/ml AFB₁).

Figure 2

A



B

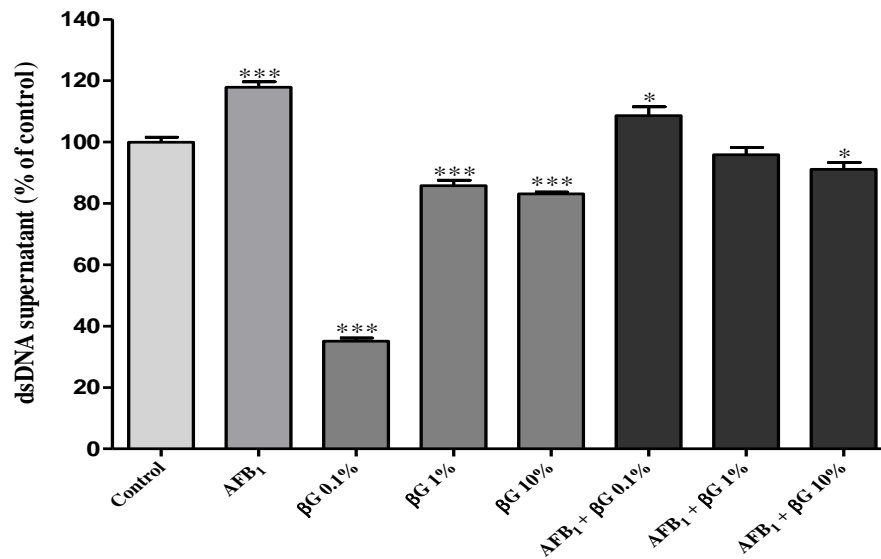


Fig. 2. Double-stranded DNA supernatant levels at 24 h in broiler chicken lymphocytes culture. (A) Cells were exposed to increasing concentrations of AFB₁. (B) Cultures containing increasing concentrations of β-glucan (βG) and/or 20 µg/ml of AFB₁ were analyzed by the PicoGreen assay. Values are expressed as mean ± SEM of three independent experiments **p* < 0.05, ****p* < 0.001 compared to the control group (0% βG and 0 µg/ml AFB₁).

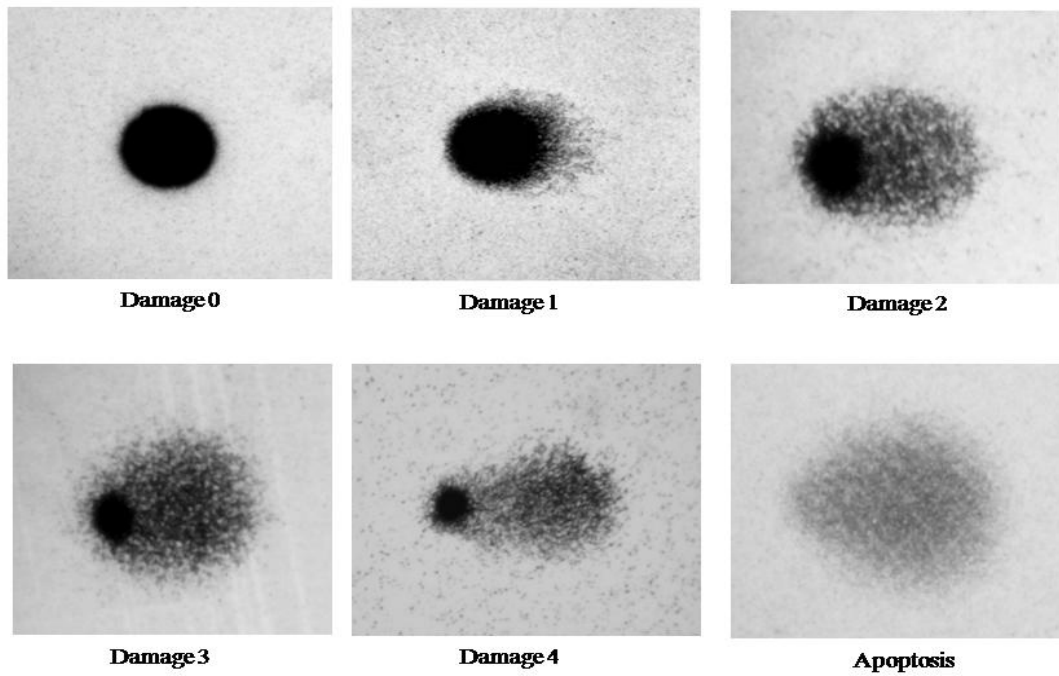
Figure 3

Fig. 3. DNA Comet image of broiler chicken lymphocytes showing nucleus without damage, and the nucleus with different damage levels.

Figure 4

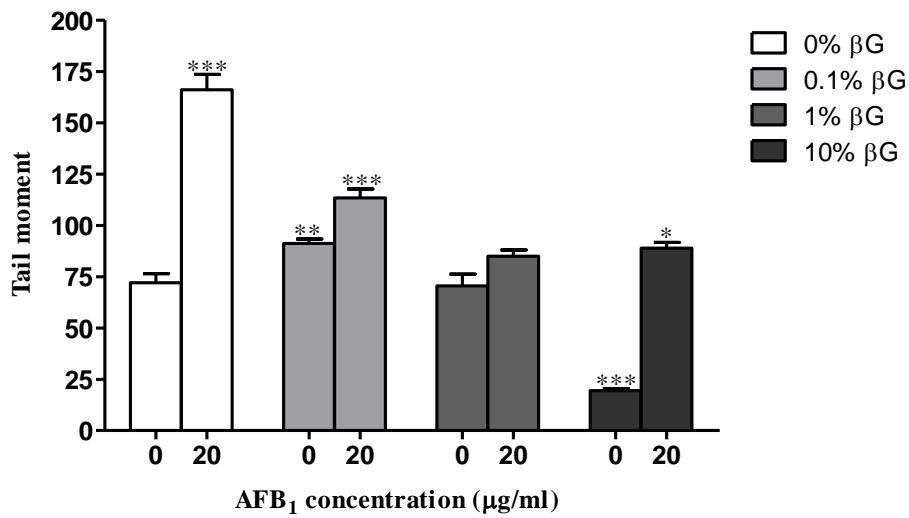


Fig. 4. Effect of β -glucan on AFB₁-induced broiler chicken lymphocyte DNA damage measured by the tail moment. DNA damage of lymphocyte cultures containing increasing concentrations of β -glucan (β G) and/or 20 μ g/ml of AFB₁ was measured by the DNA Comet Alkaline Assay at 72 h of incubation. Values are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared to the control group (0% β G and 0 μ g/ml AFB₁).

Table 1

Table 1. Effect of different β -glucan (β G) concentrations on reactive oxygen species (ROS) levels of broiler chicken lymphocytes exposed to 20 μ g/ml AFB₁.

Treatments	ROS levels (% of control)		
	24h	48h	72h
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Control	99.9 \pm 1.5	100 \pm 2.3	99.9 \pm 4.3
AFB ₁	117.9 \pm 3.8 ^{***}	102.8 \pm 3.7	101.1 \pm 7.3
β G 0.1%	80.9 \pm 1.9 ^{***}	102.9 \pm 2.3	99.8 \pm 1.9
β G 1%	86.3 \pm 3.5 ^{**}	104.9 \pm 7.0	105.9 \pm 3.5
β G 10%	118.0 \pm 7.9 ^{***}	115.1 \pm 7.2 ^{***}	124.5 \pm 3.0 ^{***}
AFB ₁ + β G 0.1%	85.4 \pm 5.1 ^{***}	106 \pm 3.2	107.2 \pm 1.2
AFB ₁ + β G 1%	120.7 \pm 5.4 ^{***}	102.6 \pm 4.5	104.1 \pm 1.5
AFB ₁ + β G 10%	126.6 \pm 6.8 ^{***}	133.4 \pm 4.3 ^{***}	125.4 \pm 9.5 ^{***}

The ROS levels were compared among treatments in each time by one-way ANOVA followed by the Dunnett post hoc test. Different letters indicated significant differences at *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

DISCUSSÃO

O funcionamento adequado do sistema imune depende de interações sinérgicas e antagônicas desempenhadas pelos alimentos ingeridos, que modulam as reações imunológicas envolvendo processos infecciosos e o metabolismo (YUNUS et al., 2011). Doenças de origem alimentar são muito comuns, principalmente em decorrência de alimentos contaminados por micotoxinas, que afetam de forma negativa a qualidade e segurança alimentar (FRIEDMAN; RASOOLY, 2013).

Estima-se que 25% das culturas alimentares mundiais, incluindo alimentos básicos, são afetadas por fungos micotoxigênicos e cerca de um bilhão de toneladas de alimentos por ano são perdidas por causa das micotoxinas (MORETTI et al., 2013). Detrimentos também ocorrem na produção animal de frangos de corte, sendo a AFB₁ a principal micotoxina responsável pelo prejuízo. A AFB₁ frequentemente é encontrada em grãos destinados a fabricação de ração para animais e geram desordens metabólicas, que resultam em disfunções imunológicas (HAMID et al., 2013). Então se torna uma emergência para a saúde pública a melhoria na qualidade e na segurança dos alimentos para evitar eventos de intoxicação bem como doenças severas (GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012).

A utilização de modelos *in vitro* é uma ferramenta útil para o estudo de disfunções metabólicas e investigação da competência imune do hospedeiro, que pode ser avaliada através de parâmetros como a produção de anticorpos, proliferação de linfócitos e atividade fagocítica (AKRAMIENË et al., 2007). Os linfócitos são células que podem ser eficazes para medir a disfunção induzida quimicamente (FAIRBROTHER et al. 2004). Estas células possuem funções complementares na manutenção da homeostase dos tecidos e proporcionam proteção durante a resposta imune (RANKIN et al., 2013).

Notavelmente, a maioria dos estudos *in vitro* sobre aflatoxicoses, avaliam respostas imunes em cultura de células de hepatócitos (SHEN et al 1996) e esplenócitos (WANG et al 2012). O presente estudo determinou a resposta linfoproliferativa de sangue periférico de frangos de corte expostos a diversas concentrações de AFB₁. Os resultados demonstraram que a AFB₁ diminui a viabilidade dos linfócitos de frangos de corte e estão de acordo com estudos *in vivo* relatados por Oguz e colaboradores (2003) em frangos e por Hinton e colaboradores (2003) em ratos.

A resposta citotóxica se deve, principalmente, ao metabólito reativo, 8,9-epóxido de AFB₁, que após ser biotransformado, pelo CYP-450 presente nos linfócitos, liga-se ao DNA formando adutos e danificando o código genético, que regula o crescimento celular

(VERMEULEN et al., 2003). Quando a AFB₁ se liga ao DNA mitocondrial, impede a produção de ATP e FAD / NAD ligada a funções enzimáticas, provocando a ruptura das funções mitocondriais e conseqüentemente a redução de ATP, podendo levar a morte celular (BBOSA et al., 2013). Essa evidência está relacionada à liberação de EROS intracelular e de fita dupla (ds) de DNA dos linfócitos em um curto período de tempo (24 h). A fluorescência emitida para a quantificação do dsDNA apresenta relação positiva entre o nível de danos causados ao DNA, bem como, é proporcional a concentração exposta de AFB₁ (MIRANDA et al., 2007). O envolvimento das EROS em lesão celular induzida por AFB₁ também foi confirmado em células mononucleares de baço (MARY et al., 2012).

Alterações intracelulares decorrente da exposição a AFB₁ são produzidas na estrutura do DNA, que também podem ser resultante indiretamente de danos oxidativos, gerados a partir da peroxidação lipídica, bem como de oxidação das proteínas (MARY et al., 2012) e favorecem a predisposição a malignidades (GROSS-STEINMEYER; EATON, 2012; MATSUDA et al., 2013). A formação equilibrada de EROS tem um papel relevante na sinalização celular, pois mantem a homeostase celular adequada. Entretanto o excesso de produção de EROS pode interagir com componentes celulares, como a mitocôndria e a membrana celular, e afetar a integridade do DNA (BERLO et al., 2012), ocasionando apoptose celular (KAO et al., 2011).

Já alterações clínico-patológicas em frangos de corte em decorrência da exposição à AFB₁, através de dietas, são evidenciadas no fígado, rim, baço, timo e bursa de Fabrício e foram relatadas por Kumar e colaboradores (2013) e Ortatli e colaboradores (2013). Os dois trabalhos relataram degeneração hidrópica em hepatócitos, hiperplasia do ducto biliar e necrose periportal e infiltração de células mononucleares e heterófilos.

Um sistema imune funcional é um requisito básico na produção moderna de animais. A interação envolvendo nutrição e imunidade é um fator estratégico para obter um bom desempenho em frangos de corte, visando a modulação imunológica via suplementação dietética (CHAE et al., 2006; RIEDER et al., 2013). No entanto, o mecanismo pelo qual a imunomodulação é obtida permanece desconhecido. Evidências científicas revelam que imunomoduladores dietéticos podem ser úteis na prevenção e tratamento de doenças, como também aumentando a imunocompetência e o desempenho dos animais destinados à alimentação. Estudos demonstraram que as β -glucanas possuem atividade imunoestimulante em humanos (CHAN et al., 2007), espécies de peixes, frangos, ratos, coelhos e porcos (CHAE et al., 2006; GUO et al., 2003).

Os resultados apresentados no presente estudo admitem que as concentrações de β -glucanas testadas, derivadas da parede de *S. cerevisiae*, são capazes de estimular a proliferação de linfócitos e também de adsorver a AFB₁ quando avaliadas em ensaios de citotoxicidade. Assim, as β -glucanas promovem imunomodulação e conseqüentemente protegem os linfócitos, mantendo a longevidade celular. Recentemente, Pizzolitto e colaboradores (2013) induziram aflatoxicose experimental em aves domésticas e após, trataram com *S. cerevisiae* CECT 1891. Os resultados apontaram que a levedura apresenta efeito positivo sobre a proteção do peso relativo do fígado e parâmetros bioquímicos, reduzindo os efeitos adversos da AFB₁ sobre os parâmetros de desempenho do crescimento.

A ligação AFB₁- β -glucana ocorre através de pontes de hidrogênio e principalmente interações de van der Waals, as quais mantêm a micotoxina presa no interior da hélice da β -glucana (YIANNIKOURIS et al., 2006). Como as β -glucanas não penetram nas células, elas se ligam aos linfócitos através de receptores celulares, especialmente dectina-1, iniciando a resposta imune (BROWN, 2005; YIANNIKOURIS et al., 2006). Após ocorrer a ligação das β -glucanas aos receptores, elas estimulam vias de sinalização intracelular, que desencadeiam a ativação, translocação nuclear e ligação de proteínas ativadoras da transcrição e imunoreguladores (KUBALA et al., 2003).

Chan e colaboradores (2007), corroborando com este estudo, relataram que a β -glucana também induz proliferação de células mononucleares de sangue periférico humano. Além disso, Suzuki e colaboradores (1990) relataram que a administração oral de β -glucanas em ratos estimulou a proliferação de células do baço. Já Cho e colaboradores (2013) avaliaram a influência das β -glucanas, na dieta, sobre o crescimento, perfil sanguíneo, peso relativo dos órgãos e a qualidade da carne em frangos, e sugeriram que a inclusão de 0,1% de β -glucanas melhoraria o desempenho do crescimento e da qualidade da carne dos frangos. Resultados contraditórios foram mencionados por Hiss e Sauerwein (2003), os quais não encontraram qualquer efeito sobre parâmetros imunológicos via suplementação com 0,03% de β -glucanas em suínos.

A exposição crônica a AFB₁ desencadeia genotoxicidade, levando a danos oxidativos biomoleculares, que nem sempre são reparados, predispondo a doenças infecciosas, como também ao hepatocarcinoma (HAMID et al., 2013). A deficiência nas vias de reparo do DNA celular é, provavelmente, um importante fator de genotoxicidade induzido pela micotoxina. Uma alternativa estratégica para prevenir ou reduzir a genotoxicidade, desencadeada pela AFB₁, pode ser através de substâncias antígenotóxicas. Tais substâncias interagem com o

DNA e podem agir bloqueando a mutação ou interagir com o mecanismo celular inibindo a mutação (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

Baseado na resposta citotóxica induzida pela AFB₁ nos linfócitos foi realizado o teste do cometa para medir quebras de fita dupla e simples do DNA, em células individuais, que biomonitora a genotoxicidade (GARCÍA et al., 2004). Assim, quando analisados os linfócitos expostos à AFB₁, encontramos uma alta frequência de danos, os quais foram medidos a partir do momento da cauda do cometa. Os linfócitos tratados com 0,1% de β -glucanas não mostraram proteção nem reversão dos danos. Já em linfócitos que receberam além da micotoxina as β -glucanas a 1% houve reversão dos danos induzidos ao DNA. As β -glucanas a 10% protegeram os linfócitos não expostos a AFB₁, entretanto quando combinada com a micotoxina o efeito tóxico foi potencializado e induziram danos, caracterizando ação genotóxica. Esse mesmo fenômeno ocorreu durante a produção de EROS intracelular na concentração de 10% de β -glucanas nos três tempos analisados. Então o efeito induzido pelas β -glucanas é dependente da dose, e também da combinação com o agente xenobiótico envolvido.

Portanto, suspeita-se que os danos oxidativos podem estar envolvidos aos danos induzidos no DNA e que EROS apresentam efeito duplo, ora protegendo e sinalizando vias de reparo celular, ora potencializando a ação genotóxica da AFB₁. Como foi analisado apenas um parâmetro de estresse oxidativo (DCFH-DA), seria relevante a avaliação de biomarcadores oxidativos como as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase para obter resultados mais consistentes. Sendo assim, consideramos que a suplementação com β -glucana a 1% é eficaz na neutralização dos efeitos citotóxicos e na reversão dos danos ao DNA induzidos pela AFB₁, caracterizando genoproteção.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- A exposição dos linfócitos de frangos à AFB₁ causa citotoxicidade, a qual está diretamente relacionada à dose e ao tempo de exposição.

- As β-glucanas estimulam a proliferação celular e protegem os linfócitos na ausência da AFB₁, mantendo a integridade do DNA. β-glucanas a 1 e 10% são capazes também de neutralizar o efeito citotóxico da micotoxina sobre a proliferação celular. Entretanto, na concentração de 10% houve aumento das EROS e do dano ao DNA.

- β-glucanas a 1%, *in vitro*, foram capazes de reverter os danos induzidos pela AFB₁, em todos os parâmetros analisados, apresentando genoproteção em linfócitos de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

AKRAMIENĖ, D. et al. Effects of β -glucans on the immune system. **Medicina** (Kaunas), v. 43, p. 597-606, 2007.

BBOSA, G. S. et al. Review of the biological and health effects of aflatoxins on body organs and body systems. **Aflatoxins** - Recent Advances and Future Prospects. Prof. Mehdi Razzaghi-Abyaneh (Ed.), 2013.

BENJAMINI, E.; COICO, R. SUNSHINE, G. Elementos das imunidades inata e adquirida. In: __. **Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, p. 13-14, 2002.

BERLO, D. V. et al. Carbon nanotubes: an insight into the mechanisms of their potential genotoxicity. **Swiss Med Wkly**, v. 142, p. 1-16, 2012.

BROWN, G. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. **Nat Rev Immunol**, v. 6, p. 33-43, 2005.

CALVO, A. Mycotoxins. In: Sikorski, Z. E.; Dabrowski, W. M. **Toxins in Food**. Ed. CRC Press LLC, cap. 9, 2005.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M. Estudo hematológico em aves inoculadas com *salmonella gallinarum*. **Arq Inst Biol**, v. 70, p. 35-42, 2003.

CELIK, I. et al. Efficacy of polyvinylpyrrolidone in reducing the immunotoxicity of aflatoxin in growing broilers. **Br Poult Sci**, v. 41, p. 430-439, 2000.

CHAE, B. J. et al. Effects of supplementation of β -glucan on the growth performance and immunity in broilers. **Res Vet Sci**, v. 80, p. 291-298, 2006.

CHAN, G.; CHAN, W.; SZE, D. The effects of β -glucan on human immune and cancer cells. **J Hemat Oncol**, v. 1, p. 25, 2009.

CHAN, W.K. et al. Response of human dendritic cells to different immunomodulatory polysaccharides derived from mushroom and barley. **Int Immunol**, v. 19, p. 891-899, 2007.

CHO, J. H.; ZHANG, Z. F.; KIM, I. H. Effects of single or combined dietary supplementation of β -glucan and kefir on growth performance, blood characteristics and meat quality in broilers. **Br Poult Sci**, v. 54, p. 216-21, 2013.

CUTLER, J. L. The enhancement of hemolysin production in the rat by zymosan. **J Immunol**, v. 84, p. 416-419, 1960.

DE COPPI, P; BARTSCH, G. JR. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. **Nat Biotechnol**, v. 25, p. 100-106, 2007.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L. R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutat Res**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DI CARLO, F. J.; FIORE, J. V. On the composition of zymosan. **Science**, v. 127, p. 756-157, 1958.

FAIRBROTHER, A.; SMITS, J.; GRASMAN, K. A. Avian immunotoxicology. **J Toxicol Envir Health B**, v. 7, p. 105-137, 2004.

FILAZI, A.; SIRELI, U. T. Occurrence of Aflatoxins in Food. **Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects**, Prof. Mehdi Razzaghi-Abyaneh (Ed.), 2013.

FRIEDMAN, M.; RASOOLY, R. Review of the inhibition of biological activities of food-related selected toxins by natural compounds. **Toxins**, v. 5, p. 743-75, 2013.

GARCÍA, O. et al. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay. Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. **Mutat Res**, v. 556, p. 25-34, 2004.

GIAMBRONE, J. J. et al. Interaction of aflatoxin with infectious bursal disease virus infection in young c hickens. **Avian Dis**, v. 22, p. 431-439, 1978.

GOMPERTZ, O. F. et al. Características gerais dos fungos. In: L. R. Trabulsi e F. Alterthum Microbiologia. São Paulo: Atheneu, p. 760, 2008.

GORDON, M. et al. A placebo-controlled Trial of the immune modulador, lentinan, in HIV-positive patients: a Phase I/II Trial. **J Med**, v. 29, p. 305-330, 1998.

GROSS-STEINMEYER, K.; EATON, D. L. Review: Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B₁. **Toxicol**, v. 299, p. 69-79, 2012.

GUO, Y.; ALI, R. A.; Qureshi, M. A. The influence of β -glucan on immune responses in broiler chicks. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v. 25, p. 461-472, 2003.

HALLIWELL, B., WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, p. 231-255, 2004.

HAMID, A. S. et al. Aflatoxin B₁-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention (Review). **Oncol Lett**, v. 5, p. 1087-1092, 2013.

HINTON, D. M. et al. Immunotoxicity of aflatoxin B₁ in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. **Toxicol Sci**, v. 73, p. 362-377, 2003.

HISS, S., SAUERWEIN, H. Influence of dietary β -glucan on growth performance, lymphocyte proliferation, specific immune response and heptoglobulin plasma concentrations in pigs. **J Anim Physiol An Nutr**, v. 87, p. 2-11, 2003.

HOHL, T. M. et al. Caspofungin modulates inflammatory responses to *Aspergillus fumigates* through stage-specific effects on fungal β -glucan exposure. **J Infect Dis**, v. 198, p. 176-85, 2008.

HOPMANS, E. C. Patulin: a Mycotoxin in Apples. **Perishables Handling**, quarterly issue, n. 91, p. 5-6, 1997.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicol**, v. 167, p. 101-134, 2001.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some Naturally Occurring Substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: **IARC Monographs on the carcinogenic risk to Humans**, v. 56. Lyon, France, 1993.

IHESHIULOR, O. O. M.; et al. Effects of mycotoxins in animal nutrition: A Review. **Asian-australas J Anim Sci**, v. 5, p. 19-33, 2011.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Ann Rev Immunol**, v. 20, p. 197-216, 2002.

JENEY, G., ANDERSON, D. P. Glucan injection or bath exposure given alone or in combination with a bacterin enhance the nonspecific defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 116, p. 315, 1993.

KALPANA, S. et al. Effects of aflatoxin B₁ on tissue residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in broiler chickens. **Environ. Toxicol Pharmacol**, v. 33, p. 121-6, 2012.

KAO, P. F., et al. Structural characterization and antioxidative activity of low-molecular-weights β -1,3-glucan from the residue of extracted ganoderma lucidum fruiting bodies. **J Biomed Biotechnol**, ID 673764, p. 1-8, 2012.

KIM, K. S.; YUN, H. S. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enz Microb Technol**, v. 39, p. 496-500, 2006.

KLASING, K. C. Avian macrophages: regulators of local and systemic immune responses. **Poult Sci**, v. 77, p. 983-989, 1998.

McINTOSH, M.; STONE, B. A.; STANISICH, V. A. Curdlan and other bacterial (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 68, p. 163-173, 2005.

KOBASHIGAWA, E. **Ocorrência de aflatoxinas e fumonisinas em sistema de produção de frangos de corte no Estado de São Paulo**. 2010. 114 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, São Paulo, 2010.

KOGUT, M. H.; KLASING, K. An immunologist's perspective on nutrition, immunity, and infectious diseases: introduction and overview. **J Appl Poult Res**, v. 18, p. 103-110, 2009.

KORVER, D. R. Overview of the immune dynamics of the digestive system. **J Appl Poult Res**, v. 15, p. 123-135, 2006.

KUBALA, L. et al. The effect of (1-3)- β -D-glucans, carboxymethylglucan and schizophyllan on human leukocytes in vitro. **Carbohydr Res**, v.338, p.2835-2840, 2003.

KUMAR, D. S.; et al. Amelioration of hepatotoxicity induced by aflatoxin using citrus fruit oil in broilers (*Gallus domesticus*). **Toxicol Ind Health**, 2013.

LEESON, S.; DIAZ, G.J.; SUMMERS, J.D. **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. University Books, Guelph, Ontario, p. 249-280, 1995.

LEONG, Y. H. et al. Exposure measurement of aflatoxins and aflatoxina metabolites in human body fluids. A short review. **Mycotoxin Res**, v. 28, p. 79–87, 2012.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E. et al. Antigenotoxic studies of different substances to reduce the dna damage induced by aflatoxin B₁ and ochratoxin A. **Toxins**, v. 2, p. 738-757, 2010.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H. β -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Semin-Ciênc Agrar**, v. 29, p. 631-650, 2008.

MARAI, I. F. M.; ASKER, A. A. Aflatoxins in rabbit production: hazards and control. **Trop subtropical agroecosyst**, v. 1, p. 1-28, 2008.

MARIN, D. E., TARANU, I. Overview on aflatoxins and oxidative stress. **Toxin Rev**, p. 1-12, 2012.

MARY, V. S. et al. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ in rat spleen mononuclear cells. **Toxicol**, v. 302, p. 299-307, 2012.

MATSUDA, Y. et al. Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol**, v. 19, p. 2587-2590, 2013.

MIDIO, A.; MARTINS, D. **Toxicologia de alimentos**. Livraria Varela: São Paulo, p. 62-78, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. 2011.

MIRANDA, D. et al. Analysis of DNA damage induced by aflatoxin B₁ in Dunkin-Hartley guinea pigs. **Mycopathologia**, v. 163, p. 275-280, 2007.

MORETTI, A. et al. Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. **Int J Food Microbiol**, in press, 2013.

MORGULIS, M. S. Imunologia aplicada. In: MACARI, M.; FURLAN, R. L.; GONZALES, E. (Eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 375 p., 2002.

NORIEGA, M. L. V. C. **Apuntes de hematología aviar**. México: Universidad Nacional Autónoma, 70 p. (Apostila), 2000.

OGUZ, H. et al. Evaluation of humoral immunity of broilers during chronic aflatoxin (50 and 100 ppb) and clinoptilolite exposure. **Rev Med Vet**, v. 154, p. 483-486, 2003.

OHNO, N.; HASHIMOTO, T.; ADACHI, Y.; YADOMAE, T. Conformation dependency of nitric oxide synthesis of murine peritoneal macrophages by (1-3)- β -glucans *in vitro*. **Immunol Lett**, v. 53, p. 157-163, 19

OLÁH, I.; VERVELDE, L. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. **Avian Immunol**, Academic Press, 2008.

ORTATATLI, M. et al. Avaliação de alterações patológicas em frangos de corte durante a crônica de aflatoxinas (50 e 100 ppb) e exposição clinoptilolita. **Res Vet Sci**, v. 78, p. 61-8, 2005.

OSWALD, I. P.; COMERA, C. Immunotoxicity of mycotoxins. **Rev Méd Vét**, v. 149, p. 585-590, 1998.

OUESLATI, S. et al. Determinação Multi-micotoxinas em cereais e produtos derivados comercializados na Tunísia por cromatografia líquida de ultra-alto desempenho acoplada à espectrometria de massa triplo quadrupolo. **Food Chem Toxicol**, v. 50, p. 2376-2381, 2012.

PATERSON, R. M.; LIMA, N. Toxicology of mycotoxins. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. **Clin Toxicol**, Edited by A. Luch: 2010.

PERAICA, M. et al. Toxic effects of mycotoxins in humans. **Bulletin World Health Organization**, v. 77, p. 754-766, 1999.

PIZZOLITTO, R. P. et al., Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an antiaflatoxicogenic agent in broiler feedstuffs. **Poult Sci**, v. 92, p. 1655-63, 2013.

POURAHMAD, J. et al. Protective effects of fungal β -(1 \rightarrow 3)-D-glucan against oxidative stress cytotoxicity induced by depleted uranium in isolated rat hepatocytes. **Hum Exp Toxicol**, v. 30, p. 173-181, 2010.

QUEIROZ, B. et al. Fungal contamination and determination of fumonisins and aflatoxins in commercial feeds intended for ornamental birds in Rio de Janeiro, Brazil. **Lett Appl Microbiol**, p. 121-127, 2013.

RANKIN, L. et al. Diversity, function, and transcriptional regulation of gut innate lymphocytes. **Front Immunol**, v.4, p. 1-15, 2013.

REDDY, R. V.; SHARMA, R. P. Effects of aflatoxina B₁ on murine lymphocytic functions. **Toxicol**, v. 54, p. 31-44, 1989.

RIEDER, A.; et al. Generic tools to assess genuine carbohydrate specific effects on *in vitro* immune modulation exemplified by β -glucans. **Carbohydr Polym**, v. 92, p. 2075-2083, 2013.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**, v. 24, 112-119, 2001.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Rev Bras Cienc Avic**, v. 2, p. 1-15, 2000.

SHEN, H., et al. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B₁. **Free Radic Biol Med**, v. 21, p. 139-146, 1996.

SHUAIB, F. M. B., et al. Association between anemia and aflatoxin B₁ biomarker levels among pregnant women in Kumasi, Ghana. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83, p. 1077-1083, 2010.

SMITH, T. K.; CHOWDHURY, S. R.; SWAMY, H. V. L. N. Comparative aspects of *Fusarium* mycotoxicoses in broiler chickens, laying hens and turkey and the efficacy of polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent: Mycosorb®. In: Biotechnology in the feed industry, 22, 2006, Lexington, **Proceedings**... Lexington: Alltech, p. 103-109, 2006.

SUDA, M. et al. Kupffer cells play important roles in the metabolic degradation of a soluble anti-tumor (1-3)- β -D-glucan, SSG, in mice. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 15, p. 93-100, 1996.

SUZUKI, T. et al. Effect of orally administered beta-glucan in macrophage function in mice. **Int J Immunopharmacol**, v. 12, p. 675-684, 1990.

TESSARI, E. N. C. et al. Parâmetros hematológicos de frangos de corte alimentados com ração contendo aflatoxina B₁ e fumonisina B₁. **Ciêñ Rural**, v. 36, p. 924-929, 2006.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P. Efeitos da aflatoxina sobre as aves: revisão de literatura. **Rev Cien Eletr Med Vet**, v. IX, 2012.

THANH HOA, L. et al. The adjuvant effect of sophy β -glucan to the antibody response in poultry immunized by the avian influenza a H5N1 and H5N2 vaccines. **J Microbiol Biotechnol Res**, v. 21, p. 405, 2011.

THOMPSON, I. J.; OYSTON, P. C. F; WILLIAMSON, D. E. Potential of the β -glucans to enhance innate resistance to biological agents. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, p. 339-352, 2010.

U.B.A. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual**. 2012. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em: 14 abr. 2013.

U.B.A. UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório Anual**. 2013. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em: 18 jun. 2013.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; BOCKSTAELE, D. R. V. Cell cycle and apoptosis. **Cell proliferation**, v. 36, p. 165-175, 2003.

WANG, Y. C. et al. Effects of zearalenone on IL-2, IL-6, and IFN- γ mRNA levels in the splenic lymphocytes of chickens. **The ScientificWorld J**, v. 2012, ID 567327, p. 1-5, 2012.

WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **Am J Clin Nutr**, v. 80, p. 1106-1122, 2004.

WILLIAMS, D. L. et al. Immunization against *Trypanosoma cruzi*: adjuvant affect of glucan. **Int J Immunopharmacol**, v. 11, p. 403-410, 1989.

WISE, C. **Epithelial cell culture protocols**. Human Press: Totowa, 2002.

YANG X, et al. Cytochrome P450 2A13 enhances the sensitivity of human bronchial epithelial cells to aflatoxin B₁-induced DNA damage. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 270, p. 114-121, 2013.

YIANNIKOURIS, A. et al. Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-Glucans. **Biomacromolecules** -Washington- [serial online]. v. 7, p. 1147-1155, 2006.

YUNUS, A. W. et al. Aflatoxin B₁ in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: a review of history and contemporary issues. **Poult Sci**, v. 90, p. 1683-89, 2011.