

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

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMONISINA B1
NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Alice Bertotto Poersch

Santa Maria, RS, Brasil

2014

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMONISINA B1 NAS
CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL
EM CAMUNDONGOS**

Alice Bertotto Poersch

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

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

Santa Maria, RS, Brasil
2014

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

Poersch, Alice Bertotto

Efeito da exposição aguda à fumonisina B1 nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos / Alice Bertotto Poersch.-2014.
65 p.; 30cm

Orientadora: Ana Flávia Furian

Coorientador: Mauro Schneider Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, RS, 2014

1. Micotoxinas 2. Potencial de membrana mitocondrial 3. Sistema nervoso central 4. Na⁺, K⁺ ATPase. I. Furian, Ana Flávia II. Oliveira, Mauro Schneider III. Título.

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

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

**EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMONISINA B1 NAS
CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM
CAMUNDONGOS**

elaborada por
Alice Bertotto Poersch

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Ana Flávia Furian, Dr.^a
(Presidente/Orientadora)

Marilise Escobar Burger, Dr.^a (UFSM)
(1º membro da banca)

Sara Marchesan de Oliveira, Dr.^a (UFSM)
(2º membro da banca)

Ana Paula Oliveira Ferreira, Dr.^a (UFSM)
(Suplente)

Santa Maria, 24 de julho de 2014.

Aos meus pais Léo e Valéria pelo incentivo e amor.
Ao meu irmão Bernardo por me mostrar que não importa os percalços que a vida
impõe devemos sempre buscar a felicidade.
Ao Vô Nico (*in memoriam*) pelo exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado serenidade, paciência e perseverança, que foram imprescindíveis para o sucesso dessa caminhada e por, de alguma forma, me proporcionar o crescimento pessoal que desenvolvi com essa experiência.

Aos meus avós, pelo exemplo de vida, pelos ensinamentos, pelo carinho, e especialmente pelas palavras de incentivo... saudades.

Aos meus pais, Léo e Valéria, pelo apoio incondicional por toda a minha vida, por me ensinarem o que é certo, pelas chamadas à realidade e por todo amor recebido.

Ao meu irmão Bernardo, por alegrar os meus dias, mostrar que a vida vale à pena, pelas cantigas de ninar...

Ao meu noivo, Leandro, pelo companheirismo dessa vida juntos e por me deixar fazer parte da sua vida, por toda a vida.

À minha orientadora Prof.^a Ana Flávia, pela oportunidade de compartilhar o seu conhecimento e proporcionar o desenvolvimento do meu, pela paciência e por permitir que fizesse parte do seu grupo de pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Mauro por compartilhar seu tempo e conhecimento.

Aos meus amigos e colegas pela parceria, pelas risadas, pela amizade.

Aos colegas do Lab Neuro, em especial, a Silvana, a Naiéli, a Fran, ao Leandro e ao Iuri pela grande ajuda no desenvolvimento desse projeto.

À minha muito mais que colega e amiga, Clarissa, pela amizade sincera, pelo ombro amigo e por discussões científicas construtivas (algumas que era melhor não ter tido, risos) em todos esses anos de amizade.

À Ana Cláudia, minha primeira aluna de iniciação científica, por me proporcionar a experiência de ensinar e crescer juntas, e por toda a ajuda prestada.

À Camilla, por toda ajuda operacional e emocional e pelo apoio em todas as horas.

À Jéssica, pela amizade, pelas risadas e desabafos.

Ao Fernando pelo apoio na execução de experimentos.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de fazer parte do seu corpo docente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários, por auxiliarem no meu crescimento profissional.

À Capes pela bolsa de estudos concedida.

À todas aquelas pessoas, aqui não citadas, que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“O único sonho impossível de ser realizado
é aquele em que não se acredita!”

RESUMO

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

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AGUDA À FUMONISINA B1 NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS

AUTORA: ALICE BERTOTTO POERSCH
ORIENTADORA: ANA FLÁVIA FURIAN
CO-ORIENTADOR: MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA
Local e Data da Defesa: Santa Maria, 24 de julho de 2014.

As micotoxinas são metabólitos secundários, produzidas por espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Penicillium*. Geralmente as intoxicações se dão pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de alimentos derivados. Dentre os 400 diferentes tipos de micotoxinas, destacam-se as fumonisinas, em especial a fumonisina B1 (FB1) que corresponde a cerca de 70% das fumonisinas totais. Tem sido demonstrado que a toxicidade desta micotoxina pode estar relacionada com efeitos tóxicos no sistema nervoso central, envolvendo-se em processos inflamatórios e crises convulsivas. O mecanismo de toxicidade das fumonisinas está relacionado ao metabolismo dos esfingolipídios no qual o esgotamento desses esfingolipídios complexos e o acúmulo das bases esfingóides alteram funções celulares importantes, favorecendo estresse oxidativo, a inibição secundária de proteínas e excitotoxicidade. Deste modo, este estudo investigou se a FB1 é capaz de facilitar o efeito indutor de convulsões do modelo do pentilenotetrazol (PTZ). Avaliamos também o mecanismo de ação responsável por tal efeito, a fim de estudar estratégias que tornem possível a prevenção ou minimização dos seus efeitos tóxicos. Assim, camundongos machos C57BL/6 foram expostos a FB1 (8 mg/kg i.p.) ou veículo (1,6% DMSO + 0,9% NaCl i.p.) e após 30 minutos injetados com PTZ (30 mg/kg i.p.) ou veículo (0,9% NaCl i.p.). Após 15 minutos de observação, os camundongos foram eutanasiados e o córtex cerebral e o hipocampo foram coletados para a análise das enzimas Na⁺, K⁺-ATPase e o potencial de membrana mitocondrial e as atividades dos complexos I e II mitocondriais. A FB1 reduziu a latência para mioclonias e aumentou o número de mioclonias. Da mesma forma, a atividade total e da subunidade $\alpha 1$ da Na⁺, K⁺-ATPase foi aumentada no córtex cerebral de animais tratados com FB1, mas no hipocampo foi reduzida. A FB1 elevou o potencial de membrana mitocondrial no córtex cerebral, porém a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória não foram alteradas em ambas estruturas com este tratamento. O PTZ foi capaz de aumentar a subunidade $\alpha 2/\alpha 3$ da Na⁺, K⁺-ATPase no hipocampo. Assim, mostramos que a FB1 induz a neurotoxicidade, pois esta micotoxina facilitou as convulsões induzidas por PTZ, alterou o potencial de membrana mitocondrial e a atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase, que possivelmente estão mediando o mecanismo da toxicidade.

Palavras-chave: Micotoxinas. Potencial de membrana mitocondrial. Na⁺, K⁺ ATPase. Sistema nervoso central.

ABSTRACT

Master Dissertation
Graduating Program in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

EFFECT OF ACUTE EXPOSITION TO FUMONISIN B1 IN THE SEIZURE INDUCED BY PENTYLENETETRAZOLE IN MICE

AUTHOR: ALICE BERTOTTO POERSCH
ADVISER: ANA FLÁVIA FURIAN
CO-ADVISER: MAURO SCHNEIDER OLIVEIRA
Defense Place and Date: Santa Maria, July 24th, 2014.

Mycotoxins are secondary metabolites, produced by fungi species of the genus *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Claviceps*. The high incidence of toxicity is by ingestion of contaminated plant products and by consuming products derived from food. Among the 400 different mycotoxins; there are the fumonisins, especially fumonisin B1 (FB1), which corresponds to about 70% of total fumonisins. It has been demonstrated that toxicity of this mycotoxin may be related to toxic effects on the central nervous system, engaging in inflammatory processes and seizures. The mechanism of toxicity of fumonisins is related to the metabolism of sphingolipids in which the breakdown of these sphingolipids complexes and accumulation of sphingoid bases alter important cellular functions, favoring oxidative stress, inhibition of protein secondary and excitotoxicity. Thus, this work tried to investigate whether FB1 is able to enhance the inductive effect of the model of pentylenetetrazole (PTZ) seizures. We also evaluated the mechanism of action responsible for this effect, in order to study strategies that make it possible to prevent or minimize their toxic effects. So, C57BL/6 mice were exposed to FB1 (8 mg/kg i.p.) or vehicle (1.6% DMSO + 0.9% NaCl i.p.) and elapsed 30 minutes were injected with PTZ (30 mg/kg i.p.) or vehicle (0,9% NaCl i.p.). Behind 15 minutes observation, mice were euthanized and cerebral cortex and hippocampus were collected for analysis of Na⁺, K⁺-ATPase activity, membrane potential and mitochondrial complex I and II activities. FB1 reduced latency for myoclonic jerks and increased myoclonus number. Even, Na⁺, K⁺-ATPase total activity as well as subunit α 1 of this enzyme were increased in cerebral cortex of animals treated with FB1, but in hippocampus it was reduced. FB1 elevated mitochondrial membrane potential in cerebral cortex however mitochondrial complex I and II activity weren't changed in both structures with this treatment. PTZ was able to enhance Na⁺, K⁺-ATPase α 2/ α 3 subunit activity in hippocampus. Thus, we showed that FB1 induces neurotoxicity, since this mycotoxin FB1 facilitates seizures induced by PTZ, altered mitochondrial membrane potential and the enzyme Na⁺, K⁺ - ATPase activity, which are possibly mediating the mechanism of toxicity.

Key words: Mycotoxins. Mitochondrial membrane potential. Na⁺, K⁺ ATPase. Central nervous sistem.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

MANUSCRITO

- Figure 1:** Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) on seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg i.p.). Fig. 1A represents the latency for myoclonic jerks and Fig.1B the number of myoclonic jerks. Data are mean + S.E.M for number of myoclonic jerks, and median and interquartile range to latency of myoclonic jerk, n =4-9 animals in each group. * Indicates a significant difference (P < 0.05) compared with control group. 40
- Figure 2:** Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na⁺,K⁺-ATPase (2A), $\alpha 1$ (2B) and $\alpha 2/\alpha 3$ (2C) subunit in cerebral cortex of mice. Data are mean + S.E.M, n=5-7 animals in each group. ** Indicates a significant difference (P < 0.01) compared with vehicle group. 41
- Figure 3:** Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na⁺,K⁺-ATPase (3A), $\alpha 1$ (3B) and $\alpha 2/\alpha 3$ (3C) subunit in hippocampus of mice. Data are mean + S.E.M, n =5-7 animals in each group. * Indicates a significant difference (P < 0.05) and ** Indicates a significant difference (P < 0.01) compared with vehicle group. 42
- Figure 4:** Effect of exposure to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on mitochondrial membrane potential of cerebral cortex of mice. Data are mean + S.E.M, n=4 animals in each group. * Indicates a significant difference (P < 0.05) compared with vehicle group..... 43
- Figure 5:** Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on mitochondrial complex I activity of cerebral cortex (5A) and hippocampus (5B) in mice. Data are mean + S.E.M n=4 animals in each group..... 44
- Figure 6:** Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on mitochondrial complex II activity of cerebral cortex (6A) and hippocampus (6B) in mice Data are mean + S.E.M n=4 animals in each group..... 45

ANEXOS

- Anexo A- Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) on seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg i.p.). Fig. 7A represents the latency for tonic-clonic seizure and Fig. 7B its duration. Data are median and interquartile, n=4 animals in each group. 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina-5'-trifosfato

ADP: adenosina-5'-difostato

Ca²⁺: Íon cálcio

sintase

DMSO: Dimetilsulfóxido

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)

FB1: Fumonisina B1

FB2: Fumonisina B2

FB3: Fumonisina B3

FB4: Fumonisina B4

FXYP: Fenilalanina-X-tirosina-aspartato

GABA: Ácido gama-aminobutírico

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agência Nacional para Pesquisa sobre o Câncer)

i.c.v.: intracerebroventricular

i.p.: Intraperitoneal

K⁺: Íon potássio

kg: Quilograma

JECFA: Expert Committee on Food Additives (Comitê Misto FAO/OMS de Peritos no Domínio dos Aditivos Alimentares)

mg: Miligramas

Mg²⁺: Íon magnésio

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótideo Hidrogênio

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fostato Hidrogênio

NMDA: N-metil D-Aspartato

NOAEL: Nível de efeito adverso não observado

NRS: Espécies Reativas de Nitrogênio

PEPS: Potencial excitatório pós-sináptico

PIPS: Potencial inibitório pós-sináptico

PTZ: Pentilenotetrazol

SNC: Sistema Nervoso Central

s.c.: subcutânea

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

WHO: World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1.Micotoxinas	15
1.2.Fumonisinias	17
1.3. Na⁺, K⁺ ATPase.....	23
1.4. Possível relação entre a neurotoxicidade induzida por FB1, Dano Mitochondrial e o desenvolvimento de convulsões	26
1.5. Justificativa	30
1.6. Objetivos.....	32
1.6.1. Objetivo Geral	32
1.6.2. Objetivos Específicos	32
2. MANUSCRITO	33
3. CONCLUSÕES	54
3.1. Conclusão Geral.....	54
3.2. Conclusões Específicas	54
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
5.1. ANEXOS	65

1. INTRODUÇÃO

Microorganismos, dentre eles os fungos, são seres imprescindíveis para a existência da vida. Existem na maioria dos lugares: no solo, na água, no ar, nos alimentos, na pele e nas mucosas de homens e animais. Alguns são benéficos e outros ao menos não produzem nenhum dano, já outros são prejudiciais e são responsáveis por causar doenças em animais, nos homens e nas plantas. Em relação aos alimentos, há microorganismos que auxiliam na elaboração de diferentes produtos, como queijos, cerveja e vinho, outros servem como marcadores de qualidade sanitária, e há, ainda, aqueles que alteram características organolépticas e também microorganismos patógenos capazes de desenvolver doenças ao serem ingeridos com alimentos (TORRES, 2008).

O desenvolvimento de uma doença pode ser consequência da produção de substâncias tóxicas, sendo estas capazes de penetrar em um organismo humano e animal por qualquer via e ser absorvido, bloqueando o metabolismo normal desse organismo. No caso da toxicologia alimentar a principal via de exposição a este tipo de substância é a via oral, mediante consumo de alimentos e água contaminados. A principal forma de controle da exposição a substâncias tóxicas em alimentos é a pesquisa e monitoramento de sua fonte e origem. Essas características são critérios para a classificação em naturais (componentes alimentares e toxinas produzidas por microorganismos) ou antropogênicos (intencionais, acidentais ou decorrentes do processamento de alimentos). Os níveis a quais homens e animais são expostos estão correlacionados à fonte de toxicidade, os quais são determinados pela dose aplicada (no caso de intencionais), a concentração de resíduos nos alimentos, a quantidade e a frequência de consumo destes (TORRES, 2008).

Neste contexto, a garantia da inocuidade dos alimentos constitui um desafio para produtores, comerciantes e autoridades de saúde. Há diversos fatores que podem causar contaminação direta e indireta por compostos químicos que provocam danos a saúde. Dentre estes fatores encontra-se um de extrema importância, as micotoxinas, metabólitos secundários de fungos, devido a sua grande distribuição na natureza, não se limitando a determinadas regiões, constituindo um problema mundial (TORRES, 2008; WU *et al.*, 2014).

É de conhecimento geral que a ingestão de alguns cogumelos (macrofungos) pode apresentar riscos à saúde humana. Entretanto, não apenas cogumelos possuem esta característica. Inúmeros estudos vêm demonstrando que as micotoxinas, ao entrarem na

cadeia alimentar, têm sido responsáveis por verdadeiras epidemias em humanos e animais. O caso mais conhecido é o do ergotismo, que foi responsável pela morte de milhares de pessoas na Europa, no milênio passado, porém casos menos divulgados, como a aleuquia alimentária tóxica, que matou cerca de 100.000 russos entre 1942 e 1948; a stachybotryotoxicose, que matou milhares de cavalos, também na Rússia, em 1930 e a aflatoxicose que matou 100.000 perus jovens no Reino Unido, em 1960, sendo também responsabilizada pela morte de outros animais e até, provavelmente, de humanos também demonstram a importância do problema que estas micotoxinas podem acarretar (FREIRE *et al.*, 2007).

1.1. Micotoxinas

O termo micotoxina tem a sua origem na junção da palavra grega *mykes*, que significa fungo, e do latim *toxicum*, que significa toxina, que numa linguagem simples significa um “fungo tóxico” (ANDRADE, 2004).

As micotoxinas são metabólitos secundários, aparentemente sem função no metabolismo de fungos, caracteristicamente invisíveis, inodoras, insípidas e tóxicas. São produzidas por uma variedade de fungos filamentosos, especialmente por espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, e *Penicillium* (REVERBERI *et al.*, 2010). Um mesmo fungo pode produzir simultaneamente diferentes tipos de micotoxinas, ou seja, a dieta diária pode estar contaminada com várias dessas, entretanto nem todos os fungos são capazes de produzi-las (SABINO, 1996).

Sabe-se que cerca de 25% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo estão contaminados com alguma micotoxina. Na posição de um dos países líderes na produção de alimentos agrícolas e de commodities, o Brasil possui condições ambientais excelentes para o desenvolvimento de todos esses fungos micotoxigênicos (FREIRE *et al.*, 2007). Fatores ambientais, como luz, oxigênio, temperatura, umidade relativa do ar e umidade do substrato, determinam o tipo de fungo que irá se desenvolver e a classe de micotoxinas que será produzida. A presença de nutrientes, na qual a fonte de carbono (tipo de açúcar, ácido graxo) também é importante, assim como a fonte de nitrogênio, o pH e a presença de íons metálicos (SABINO, 1996; TORRES, 2008).

Micotoxinas são moléculas um tanto quanto diferentes, com estrutura que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando peso molecular de até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com peso molecular total maior de 500 Da e que não apresentam imunogenicidade (BETINA, 1984; SABINO, 1996).

As micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta dos alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas permanecerão no produto final. A contaminação direta por outro lado, ocorre quando o produto, alimento ou a ração, se torna contaminado por um fungo toxigênico, tanto durante a produção, quanto durante o processamento, o transporte ou armazenamento (FRISVAD, 1992).

A intoxicação por micotoxinas pode ocorrer através da inalação, ingestão ou contato com a pele humana. Entretanto, a maior ocorrência se dá pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados dos alimentos, tais como leite, queijo, carnes e outros produtos animais (SMITH, 1995).

Estudos revelam que as micotoxinas podem ser prejudiciais a saúde humana e animal, de forma aguda ou crônica, dependendo da concentração ingerida e do tempo de exposição (BONDY *et al.*, 1995; MEHTA *et al.*, 1998; THEUMER *et al.*, 2010; HASSAN *et al.*, 2010). As micotoxicoses agudas são um problema de saúde animal já que os alimentos contaminados são geralmente recusados pelo homem e muitas vezes desviados para a alimentação animal, assim como possuem manifestações e intensidade específicas. Para o homem a toxicidade crônica representa maior preocupação, uma vez que está ligada a ingestão de pequenas quantidades por um longo período de tempo. Para este tipo de intoxicação é mais difícil estabelecer uma relação causa-efeito, uma vez que os sintomas se manifestam de maneira tardia e a intensidade e os efeitos podem variar de acordo com outros fatores, como sexo, idade, estado de saúde, composição da dieta, tipo e concentração da micotoxina no alimento, exposição simultânea a outros agentes tóxicos e o tempo de exposição. Também é comum que os alimentos apresentem mescla de diferentes micotoxinas que podem atuar de forma sinérgica (FERNANDEZ-SURUMAY *et al.*, 2005).

Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, erupção cutânea, descamação, sensação de queimação, fotossensibilidade a sinais e sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade (tremores, incoordenação, depressão, dor de cabeça), hematotoxicidade (aumento da fragilidade vascular, hemorragia nos tecidos do

corpo, ou do pulmão), genotoxicidade (SMITH, 1995), podendo resultar em crescimento retardado, reprodução alterada, diminuição da imunidade e da resistência a doenças infecciosas (CALDAS, 2002). Em específico quanto a seus efeitos nos animais, geralmente causam reações alérgicas, baixo índice reprodutivo, perda de apetite, emagrecimento, desenvolvimento de tumores, podendo resultar em morte (LEDOUX *et al.*, 1992).

Existem pelo menos 400 diferentes tipos de micotoxinas, sendo que as micotoxinas de maior risco a saúde humana e animal são: aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, desoxinivalenol e fumonisinas, entre outras (BENNETT e KLICH, 2003).

1.2. Fumonisinias

As fumonisinas foram inicialmente descritas e caracterizadas em 1988 no Sul da África (GELDERBLOM *et al.*, 1988; MARASAS, 2001) e classificadas como possivelmente cancerígenas para humanos (Grupo 2B) desde 1993 pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC). Estas substâncias são produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium*, especialmente *Fusarium verticillioides* (anteriormente classificado como *Fusarium moniliforme*), *Fusarium proliferatum* e *Fusarium nygamai*, além da *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* (BENNETT e KLICH, 2003).

A presença de fumonisinas em grãos de milho tem sido associada a casos de câncer de esôfago em habitantes das regiões de Transkei (Sul da África), China e nordeste da Itália (PERAICA *et al.*, 1999). São também responsáveis por leucoencefalomalácia (necrose focal do cérebro, principalmente da substância branca cortical) em equinos e coelhos (VOSS *et al.*, 2007), pela indução de edema pulmonar e hidrotórax em suínos (HARRISON *et al.*, 1990) e efeitos hepatotóxicos, carcinogênicos e apoptóticos no fígado e nefrotoxicidade em ratos (GELDERBLOM *et al.*, 1996; POZZI *et al.*, 2001). No Brasil, essas micotoxinas já foram detectadas em vários substratos, especialmente no milho para ração animal (RILEY *et al.*, 1993; HIROOKA *et al.*, 1996).

Ao contrário de outras micotoxinas, as quais são solúveis em solventes orgânicos, as fumonisinas são hidrossolúveis, e constituem um grupo que engloba 16 substâncias denominadas de B (FB1, FB2, FB3 e FB4), A1, A2, A3, AK1, C1, C3, C4, P1, P2, P3, PH1a e PH1b (SEO e LEE, 1999).

A FB1 é a fumonisina com maior potencial toxicológico, representando cerca de 70% das fumonisinas totais. Possui em sua estrutura um diéster de propano 1,2,3- ácido tricarbóxico e 2-amino-12, 16 dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxicosano. A porção amino terminal presente na molécula mostra-se necessária para a sua função biológica (STOCKMANN-JUVALA e SAVOLAINEN, 2008), uma vez que estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a N-substituição na molécula da fumonisina, como a N-acetilfumonisina ou N-carboximetilfumonisina, resultou na perda dos seus efeitos tóxicos (HOWARD *et al.*, 2002). As fumonisinas B2, B3 e B4 são em ordem menos prevalentes e diferentes estruturalmente da FB1 em número e arranjo de grupamentos hidroxil na cadeia hidrocarbonada principal (MERRILL *et al.*, 2001; RILEY *et al.*, 2001).

Em humanos, não há estudos sobre o metabolismo e parâmetros toxicocinéticos das fumonisinas. Em animais de experimentação, as fumonisinas são mal absorvidas via gastrointestinal e, uma vez que entram neste trato, são distribuídas e eliminadas rapidamente na forma original (80% nas fezes e 3% na urina) e pequenas concentrações são depositadas no fígado e nos rins. Além disso, nenhuma evidência de transporte transplacentário foi encontrada, sugerindo que o metabolismo endógeno e acúmulo no útero são improváveis (SHEPHARD *et al.*, 1994).

Os rins e o fígado são principais alvos quando esta micotoxina é administrada através das vias intraperitoneal e intravenosa (SHEPHARD *et al.*, 1994), porém o órgão-alvo pode variar de acordo com a espécie, cepa, sexo e dose. Por exemplo, o efeito tóxico da fumonisina nos rins é menor do que aqueles para o fígado em ratos Sprague-Dawley (RILEY *et al.*, 1994; HOWARD *et al.*, 2001) e Fischer 344 (HOWARD *et al.*, 2001). Também foi visto que ratos machos são mais sensíveis que as fêmeas em relação à nefrotoxicidade. Além disso, foi demonstrado que os coelhos são muito sensíveis aos efeitos renais das fumonisinas (BUCCI *et al.*, 1998).

Adicionalmente, VOSS *et al.* (1998) relataram um aumento da taxa de lesões hepáticas e renais em ratos após uma exposição de três semanas com alimentos contaminados com 32 a 49 mg/kg de FB1. Enquanto o fígado e os rins são órgãos muito sensíveis à toxicidade aguda de fumonisinas, o sistema imunológico também é afetado, principalmente após exposição crônica à micotoxina (BOERMANS e LEUNG, 2007). A exposição oral de 1,75 mg/kg da micotoxina por dia é letal para coelhos, resultando em toxicidade renal e hepática, leucoencefalomalácia e hemorragia cerebral (BUCCI *et al.*, 1996). Aves e bovinos são consideravelmente menos sensíveis a fumonisina que cavalos, porcos, coelhos e roedores de laboratório (HASSAN *et al.*, 2010).

O caráter carcinogênico das fumonisinas parece não envolver uma interação com o DNA (COULOMBE, 1993), mas sim devido à estrutura química similar aos precursores de cadeia longa dos esfingolipídios. Além disso, se considera que o metabolismo dos esfingolipídios seja o alvo da ação tóxica destas micotoxinas (STOCKMANN-JUVALA e SAVOLAINEN, 2008).

O metabolismo dos esfingolipídeos é formado por duas etapas: Síntese de novo a partir do complexo serina palmitoil-CoA e substituição de esfingolipídios que inclui a hidrólise de esfingolipídios complexos. Em ambas as etapas há a intervenção da enzima ceramida sintetase, a qual é bloqueada pela fumonisina. Este bloqueio leva a inibição da síntese da ceramida, adição da esfinganina e esfingosina, uma maior degradação das bases esfingóides, proveniente da dieta, e finalmente a uma redução na formação da esfingomielina (ABDEL NOUR *et al.*, 2007). A concentração de FB1 necessária para inibir 50% da atividade da enzima ceramida sintetase (IC₅₀) foi estimada em 0,1 µM para microsossomos de fígado de rato (WANG *et al.*, 1991) e cerca de 0,7 µM para neurônios (MERRILL *et al.*, 1993).

Os esfingolipídios fazem parte da membrana celular e intervêm em processos de crescimento, diferenciação e morte celular para manter a estrutura da membrana, comunicação intercelular, interação entre as células e a matriz extracelular, regulando os fatores de crescimento e atuando como segundos mensageiros (MERRILL *et al.*, 1997). O esgotamento dos esfingolipídios complexos (ceramida, esfingomielina) e o acúmulo das bases esfingóides (esfinganina e esfingosina) alteram as funções celulares mencionadas anteriormente e favorecem o estresse oxidativo e a proliferação de peroxissomas, entre outros (MARASAS *et al.*, 2004; STOCKMANN-JUVALA e SAVOLAINEN, 2008)

Através da ativação do fator de necrose tumoral, a exposição à FB1 altera o balanço, a replicação e a morte celular contribuindo para a carcinogênese (WILD e GONG, 2010). Outro mecanismo tóxico adicional se dá pela relação complexa com o metabolismo do folato. O transportador de folato reduzido e o receptor de folato necessitam da esfingomielina para a adequada incorporação do folato a célula. Em condições de deficiência de esfingomielina, a incorporação de folato é diminuída produzindo um estado de deficiência de folato (ABDEL NOUR *et al.*, 2007).

O diagnóstico da intoxicação é baseado em uma história de ingestão de milho em conjunto com sinais clínicos característicos e lesões. A elevação na razão esfinganina: esfingosina é considerado um excelente biomarcadores de exposição, podendo ser determinado por cromatografia líquida de alta eficiência em soro ou tecidos fixados com

formalina, sendo o fígado e rins os mais usuais. No entanto, o ensaio para determinação destes biomarcadores está disponível apenas para laboratórios de pesquisa e não para diagnósticos de rotina. Assim, como não há tratamento eficaz conhecido, a prevenção de intoxicação é de extrema importância (HSIAO *et al.*, 2007).

Cada país tem adotado legislação e normas específicas, com o intuito de proteger os consumidores contra os efeitos nocivos das micotoxinas em alimentos *in natura* e processados, e até mesmo em rações para animais de abate e de estimação. Existem diversos fatores que conduzem à elaboração dessas legislações. Por exemplo, existem os aspectos científicos, tais como a disponibilidade de informações toxicológicas, o conhecimento acerca da distribuição das micotoxinas nos alimentos, além da metodologia analítica. Também, devem ser considerados os aspectos políticos e econômicos, principalmente com relação aos interesses comerciais e aos impactos na disponibilidade da oferta de alimentos (VERARDI e DE FROIDMONT-GORTZ, 1995).

O continente Europeu (39 países), representando 99% da população europeia, apresenta legislações para a regulamentação de micotoxinas em alimentos e rações. Comparada com outras regiões do mundo, a Europa dispõe da mais completa e detalhada legislação sobre micotoxinas em alimentos (FREIRE *et al.*, 2007).

Neste contexto, Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)/World Health Organization (WHO) and Expert Committee on Food Additives (JECFA) estimou a prevalência de exposição na dieta a fumonisina em diversos países. Notavelmente, não houve detecção de micotoxinas, incluindo fumonisinas (FB1 e FB2), em nenhum alimento analisado na Austrália. Ao mesmo tempo, outros países demonstram altas contaminações com FB1 em amostras de grãos de cereais, por exemplo, na China (33,3 µg/kg peso corporal por dia) e Guatemala (2,2 to 10,6 µg/kg de peso corporal por dia). Por outro lado, estudo realizado no Brasil em 208 amostras de grãos de milho indicou altos índices de contaminação por fumonisinas, entre 1680 e 2040 µg/kg, e estimou-se que a exposição total a fumonisinas (FB1 + FB2) através de produtos baseados no milho foi de 0,5 e 7,1 µg/kg peso corporal por dia na população total. Assim, dado o exposto, pode-se notar o quão alto são as taxas de contaminação de alimentos e rações por fumonisinas, uma vez que a ingestão máxima diária tolerável para FB1, FB2 e FB3, isoladamente ou em combinação é de 2 mg/kg peso corporal com base no nível de efeito adverso não observado (NOAEL). Assim, o alto nível de contaminação com estas micotoxinas aumentam o risco de desenvolvimento de efeitos tóxicos provocados por tal exposição.

Com base nestes dados, pode-se perceber que apesar da tentativa de normatização dos níveis máximos toleráveis, bem como a criação de leis que determinam o controle da quantidade de micotoxinas em alimentos ainda há países em que esse controle não se mostra efetivo. Desta maneira tanto humanos como animais tornam-se vulneráveis ao diversos efeitos tóxicos que não apenas as fumonisinas proporcionam, mas também aos que as tantas outras podem causar, ou, ainda mesmo, o sinergismo entre elas.

Dentre tantos órgãos alvos já mencionados anteriormente, a neurotoxicidade tem sido estudada em diversas linhas de pesquisas tanto recentes como mais antigas. Alguns estudos mostram que a FB1 possui potencial neurodegenerativo (WILSON *et al.*, 1990; ROSS *et al.*, 1991; GELINEAU-VAN WAES *et al.*, 2005). De fato, as fumonisinas são capazes de desenvolver leucoencefalomalácia em equinos e coelhos, sendo que os equinos são altamente propensos a doenças gastrointestinais juntamente com cólicas relacionadas à endotoxemias por bactérias gram-negativas (MORRIS, 1991), que podem comprometer a integridade da barreira hematoencefálica (BURROUGHS *et al.*, 1992).

Além disso, foi demonstrado que a ação crônica da FB1 sobre o encéfalo está relacionada a células da glia, a inibição do crescimento axonal (HAREL e FUTERMAN, 1993), a inibição da formação e depósito da mielina e ao atraso na maturação de oligodendrócitos (MONNET-TSCHUDI *et al.*, 1999). Esses efeitos são pertinentes ao rompimento do metabolismo de esfingolípídios consequente a inibição da enzima ceramida sintase (MONNET-TSCHUDI *et al.*, 1999).

OSUCHOWSKI *et al.* (2005) analisaram os níveis de esfinganina e esfingosina encefálicos após a administração de 100 μ M (s.c e i.c.v.) de FB1 a camundongos e observaram que quando a micotoxina é administrada sistemicamente há um aumento dos níveis de esfinganina corticais, enquanto os níveis de esfingosina não são alterados. Já quando a administração é feita diretamente no sistema nervoso central (SNC) há um aumento dos níveis de esfingolípídios essenciais no córtex e de esfinganina no cerebelo, mesencéfalo e medula oblonga. Dessa forma, evidencia-se que a esfinganina possa ser o principal esfingolípídio essencial envolvido em processos de neurotoxicidade mediado pela FB1. Por outro lado, a esfingosina é tratada como um promotor de morte neuronal (BUCCOLIERO e FUTERMAN, 2003), devido a sua ação de promover a inibição do crescimento celular e apoptose (MACEYKA *et al.*, 2002) e, embora, pareça ter menor influência que a esfinganina, também pode auxiliar nos danos causado pelas fumonisinas.

A inibição prolongada dessa enzima leva a depleção de complexos como esfingomielina, cerebrosídeos e gangliosídeos, cruciais para a manutenção da função e

balanço estrutural do tecido neuronal (OSUCHOWSKI *et al.*, 2005). Adicionalmente, segundo GOEL *et al.* (1996) o acúmulo de esfingolípídeos essenciais tem sido relatado em equinos diagnosticados com leucoencefalomalácia, o que reitera essa relação com a neurotoxicidade apresentada pela FB1.

Os efeitos deletérios da FB1 no tecido neuronal têm sido demonstrados em inúmeros estudos, uma vez que é capaz de inibir o desenvolvimento de culturas de neurônios (HAREL e FUTERMAN, 1993), alterar as concentrações de esfinganina e a atividade de oligodendrócitos (KWON *et al.*, 2000) em ratos, e disfunção da mielinização *in vitro* (MONNET-TSCHUDI *et al.*, 1999) e *in vivo* (KWON *et al.*, 1997). A FB1, também foi responsável por alterações nos níveis de metabólitos de neurotransmissores em murinos (TSUNODA *et al.*, 1998), como também provocou alterações na atividade eletrofisiológica em neocórtex de ratos (BANCZEROWSKI-PELYHE *et al.*, 2002).

Em contra partida, um estudo realizado por DOMIJAN e ABRAMOV (2011) demonstrou que efeitos agudos da FB1 estão ligados a astrócitos e células de neuroblastoma em resultado a inibição do complexo I mitocondrial acarretando em despolarização da membrana e desregulação da via de sinalização mediada pelo cálcio. Eventos como estes levam a uma excitabilidade neuronal e precedem o dano neuronal subjacente a patologias agudas, como acidente vascular cerebral (ABRAMOV e DUCHEN, 2008). Em relação à atividade convulsiva, há evidências de que essa atividade induz liberação de cálcio e despolarização do potencial de membrana mitocondrial em neurônios (KOVACS *et al.*, 2005).

Desta forma, uma vez que a FB1 tem seu mecanismo de toxicidade envolvido com astrócitos e vias de sinalização mediadas pelo cálcio, enzimas como Na⁺, K⁺ ATPase podem ter papel determinante no desenvolvimento de efeitos neurotóxicos, como déficits de aprendizado e convulsões, mediados por esta micotoxina.

Adicionalmente, o K⁺ extracelular é um determinante crítico do potencial de repouso da membrana (RANSOM *et al.*, 2000) e mesmo pequenos aumentos na concentração desse íon extracelular pode alterar a probabilidade do neurônio disparar um potencial de ação (EVANS *et al.*, 1997), modulando a transmissão sináptica (TAKAHASHI *et al.*, 2012), reduzindo a distância entre o potencial de repouso da membrana e do limiar de ativação dos canais de Na⁺ dependentes da voltagem (BAY e BUTT, 2012). Os astrócitos, que funcionam como reservatório para a absorção rápida de K⁺ extracelular (GLITSCH, 2001), têm sido tradicionalmente considerados como células de suporte do SNC, cuja uma das principais funções é a manutenção da homeostase de K⁺ extracelular (BARRES, 2008), sendo que o

potencial de membrana altamente negativo (-85mV) é dependente da enzima Na^+ , K^+ ATPase (LUPFERT *et al.*, 2001). Além disso, as concentrações de sódio intracelular são limitantes da velocidade da atividade da Na^+ , K^+ ATPase em muitos tipos de células, incluindo os astrócitos (LUPFERT *et al.*, 2001).

1.3. Na^+ , K^+ ATPase

As adenosinas trifosfatases (ATPases) são proteínas integrais de membrana responsáveis pela troca de íons através da membrana celular, utilizando a hidrólise do ATP para obter a energia necessária para este processo. A sódio (Na^+), potássio (K^+) ATPase (Na^+ , K^+ ATPase) simultaneamente transporta 3 íons Na^+ para o meio extracelular e 2 íons K^+ para o meio intracelular. Dessa forma mantém o gradiente de Na^+ e K^+ que é de fundamental importância para a manutenção da excitabilidade neuronal, a condução do potencial de ação e o sistema de transporte secundário envolvendo a captação sináptica de neurotransmissores e a regulação do volume celular (JORGENSEN *et al.*, 2003; BENARROCH, 2011)

A Na^+ , K^+ ATPase pertence a família das ATPases do tipo P, subfamília P11, que são caracterizadas por terem um intermediário fosforilado durante o ciclo de reação. É uma enzima heterodimérica composta por uma extensa subunidade α com 10 segmentos transmembrana e uma subunidade β pesada glicosilada (BENARROCH, 2011).

A subunidade α é responsável pela atividade catalítica da enzima e sofre fosforilação e transição conformacional acoplada à hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e ao transporte de íons. Há quatro isoformas diferentes da subunidade α ($\alpha 1$ - $\alpha 4$) que são codificadas por diferentes genes e sua expressão é tecido específica. A subunidade $\alpha 1$ é expressa em todos os tecidos, incluindo neurônios e células da glia; a subunidade $\alpha 2$ é a forma predominante em astrócitos e no músculo esquelético; a subunidade $\alpha 3$ é expressa em neurônios, glândula pineal e fotorreceptores da retina e a subunidade $\alpha 4$ é expressa nos testículos. A subunidade β inclui 3 isoformas ($\beta 1$ - $\beta 3$) e é requerida para a atividade enzimática da subunidade α e das funções como proteína de adesão intercelular. A Na^+ , K^+ ATPase é frequentemente associada com a subunidade regulatória tecido específica que pertence a família de proteínas contendo a sequência de aminoácidos FXYD (fenilalanina-X-tirosina-aspartato). O componente FXYD

modula a afinidade da enzima por Na^+ e K^+ e é um alvo importante para a fosforilação (JORGENSEN *et al.*, 2003; BENARROCH, 2011).

A subunidade α existe em duas conformações: uma forma ativa desfosforilada (E1) seletiva para Na^+ e um estado fosforilado (E2) seletivo para o K^+ . A ligação de 3 íons sódio do citoplasma no sítio E1 ativa a sua fosforilação em um resíduo ácido aspártico conservado na presença de um íon magnésio (Mg^{2+}), produzindo um intermediário de alta energia que se refere ao estado E1~P. A alteração conformacional de E1~P para E2~P leva a extrusão de 3 íons sódio e a ligação de 2 íons potássio da face externa da membrana. A ligação do potássio desencadeia a desfosforilação da enzima a fim de recuperar o estado ativo E1, completando o sítio catalítico (JORGENSEN *et al.*, 2003; BENARROCH, 2011).

O estímulo primário para a Na^+ , K^+ ATPase é o aumento da concentração intracelular de Na^+ e, em menor extensão, um aumento na concentração de K^+ . Ainda, Ca^{2+} intracelular inibe a atividade da enzima por competir com o Mg^{2+} , que é crítico para a hidrólise do ATP. Esta enzima é, ainda, inibida pela ouabaína, digitalis, e diversos esteróides semelhantes à ouabaína ou a digitalis sintetizados pela glândula adrenal, hipotálamo e sistema cardiovascular periférico. A Na^+ , K^+ ATPase pode, da mesma forma, ser regulada por neurotransmissores e hormônios, como, por exemplo, a adrenalina e a aldosterona, por afetar a expressão da enzima, o estado de fosforilação ou a modulação por Ca^{2+} intracelular (LINGREL *et al.*, 2007; BENARROCH, 2011).

A atividade da Na^+ , K^+ ATPase gera um gradiente de sódio que impulsiona a captação de glutamato nos astrócitos que é crítico para o controle da sinalização glutamatérgica e proteção contra o dano excitotóxico (BENARROCH, 2011). De maneira semelhante, a Na^+ , K^+ ATPase pode regular a atividade dos transportadores de glutamato, a expressão e turnover dos receptores do glutamato via mecanismos de fosforilação (BENARROCH, 2011).

Na^+ , K^+ ATPase, pode ainda, funcionar como um receptor e molécula de sinalização envolvida na plasticidade sináptica, independente da função como bomba de prótons. Por exemplo, esta enzima pode formar complexos com fatores de crescimento e associado ao receptor do inositol 1,4,5-trifosfato gerar cascatas de transdução intracelular e oscilação do cálcio (BENARROCH, 2011).

Uma das principais causas da perda da atividade da Na^+ , K^+ ATPase é a redução da disponibilidade de ATP devido a disfunção mitocondrial em um ambiente de hipóxia, isquemia, inflamação e outras condições desencadeadas por despolarização neuronal, citotóxica, edema e doenças neuronais, axonais e gliais. A incapacidade de manter os gradientes

de sódio e potássio resulta em um colapso do potencial de membrana, perda da habilidade de transportar glutamato, influxo de água e íons cloreto, e assim, inchaço e acúmulo intracelular de cálcio, o que resulta em desregulação da cascata enzimática, levando a lesão da substância cinzenta e branca (BENARROCH, 2011).

Em condições normais, altas concentrações de potássio aumentam atividade da Na^+ , K^+ ATPase na glia o que promove a remoção de íons potássio que estão acumulados no espaço extracelular durante repetitivos disparos neuronais. Em modelos experimentais de epilepsia focal, há um decréscimo na ativação da indução da Na^+ , K^+ ATPase da glia por potássio na área do foco da epilepsia comparada com a área não epileptogênica (GRISAR *et al.*, 1992). O mesmo ocorre com neocórtex temporal anterolateral removido de pacientes com epilepsia do lobo temporal (GRISAR *et al.*, 1992). Isso pode refletir a perda da desfosforilação induzida por potássio da subunidade α em astrócitos. Estudos revelaram que um modelo de epilepsia genético, Myshkin, causado por uma mutação na isoforma $\alpha 3$ da Na^+ , K^+ ATPase, prejudica a função de bomba em neurônios, resultando em hiperexcitabilidade neuronal que manifesta crises parciais e focais (BENARROCH, 2011). Em estudos realizados com o modelo animal de indução de convulsão por PTZ, mostram-se indícios que o PTZ pode modular a atividade da Na^+ , K^+ ATPase e ser um dos mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento de crises convulsivas. RAMBO *et al.* (2013), estudaram a influência da administração de PTZ nas doses 30, 45 e 60 mg/kg em ratos Wistar e observaram que todas as doses testadas reduziram a atividade da enzima em córtex cerebral. Já estudos realizados por MARQUEZAN *et al.* (2013), demonstraram que somente a dose de 60 mg/kg de PTZ foi capaz de reduzir a atividade da enzima em córtex cerebral de camundongos Swiss, e nenhuma das doses modificou a atividade da enzima no hipocampo dos mesmos animais. Estes resultados mostram que pode haver divergência entre estudos que utilizam diferentes espécies animais.

Em relação ao efeito da FB1 e de outras micotoxinas na modulação da atividade da Na^+ , K^+ ATPase, não há estudos recentes que demonstrem a relação desta enzima com o mecanismo de toxicidade das micotoxinas. Este fato demonstra a importância de estudos que busquem novos mecanismos envolvidos nos efeitos das micotoxinas que ainda não foram explicados.

1.4. Possível relação entre a neurotoxicidade induzida por FB1, Dano Mitocondrial e o desenvolvimento de convulsões

Epilepsia é uma das doenças cerebrais mais comuns e preocupantes mundialmente. Essa condição afeta mais de 50 milhões de pessoas no mundo, sendo que aproximadamente 100 milhões de pessoas terão pelo menos uma crise epiléptica durante a sua vida. É causa de importantes consequências sociais, psicológicas, físicas e econômicas (AGUIAR *et al.*, 2012).

A epilepsia é caracterizada pela ocorrência, sem causa aparente, de repetidas crises convulsivas, desencadeadas por padrões sincrônicos e excessivos de descarga anormal de um grupo de neurônios, resultando em alterações motoras (ENGEL JR e PEDLEY, 2008.). O termo convulsão refere-se a episódios limitados da disfunção cerebral que acarretam na alteração transitória do comportamento decorrente da descarga anormal dos neurônios cerebrais (MACNAMARA, 2010). Os episódios convulsivos estão associados a um desequilíbrio entre o potencial excitatório pós-sináptico (PEPS) e o potencial inibitório pós-sináptico (PIPS), podendo também ser desencadeados por mecanismos multifatoriais independentes (KLEEN e HOLMES, 2008; CREMER *et al.*, 2009).

As causas da epilepsia são variadas, podendo ser consequência de traumatismo craniano, infecções, processo inflamatório, privação de oxigênio, tumor cerebral, ou ainda, de origem idiopática (ARANHA, 2001; GABY, 2007). Nesse contexto, estudos vêm acumulando evidências que radicais livres, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial são fatores importantes na patogênese da epilepsia (FOLBERGROVA e KUNZ, 2012). Assim, uma das principais apresentações clínicas do dano mitocondrial é a convulsão, que pode ocorrer como um sinal de encefalopatia mitocondrial. De forma geral, doenças mitocondriais são caracterizadas por epilepsia mioclônica com fibras vermelhas (KANG *et al.*, 2013).

A mitocôndria contém enzimas da cadeia respiratória que são responsáveis pela fosforilação oxidativa e produzem a principal fonte de energia celular na forma de ATP. A cadeia respiratória de elétrons consiste de cinco complexos enzimáticos: complexo I (NADH desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e V (ATP sintase). A cadeia respiratória de elétrons produz ATP por meio de um gradiente de prótons que atravessam a membrana interna da mitocôndria. A fosforilação oxidativa é precisamente regulada por diferentes condições fisiológicas, assim déficits na ocorrência desse processo, causadas por mutações no DNA ou RNA, resultam em diversos tipos de doenças mitocondriais (KANG *et al.*, 2013).

Doenças mitocondriais muitas vezes referem-se a doenças metabólicas causadas por reações anormais da cadeia respiratória, que resultam em decréscimo da energia produzida e diversos sintomas clínicos. Ainda, proteínas responsáveis por sinalização, síntese, transporte e função enzimática podem ser comprometidas em doenças mitocondriais, como a epilepsia. Essas doenças podem ser causadas por inibição direta ou indireta de enzimas do complexo da cadeia respiratória levando a deficiência na utilização do oxigênio e produção energética reduzida (KANG *et al.*, 2013). Durante a inibição da cadeia respiratória concentrações consideráveis de superóxido são produzidas, o que pode resultar em uma supra regulação de mecanismos endógenos de proteção, como a superóxido dismutase e a catalase resultando em um dano oxidativo de proteínas, fosfolipídios e DNA mitocondrial (FOLBERGROVA e KUNZ, 2012).

Neste contexto, modelos animais de indução de convulsões são muitas vezes utilizados a fim de mimetizar eventos cerebrais que ocorrem nessa doença em humanos. Deste modo, foi evidenciado em um estudo sinais similares de disfunção mitocondrial em animais epiléticos imaturos tratados com ácido homocisteico. Em relação a esses sinais foi mostrado decréscimo na atividade do complexo I mitocondrial em córtex cerebral durante a fase aguda da epilepsia, persistindo por um tempo superior a 5 semanas, período no qual desenvolveram convulsões espontâneas (FOLBERGROVA e KUNZ, 2012).

Pode-se esperar que a inibição pronunciada da atividade do complexo I no modelo de ácido homocisteico terá implicações significativas para a função mitocondrial. No entanto, os dados experimentais sugerem que as principais funções das mitocôndrias, como a produção de energia, parece não ser prejudicada. Os níveis de ATP mantiveram-se inalterados, não só durante a fase aguda das crises (períodos onde a produção de energia em cérebros imaturos é dependente da glicólise), mas também durante longos períodos de sobrevivência (quando a fosforilação oxidativa é a principal fonte de ATP). Isto pode ser explicado pelo excesso de capacidade do complexo I (FOLBERGROVA e KUNZ, 2012).

Há ainda outra consequência da inibição deste complexo. Ele não é apenas um alvo para as ROS e espécies reativas de nitrogênio (NRS), mas é também uma fonte importante para a produção de tais espécies quando o complexo é parcialmente inibido. Pode-se assumir que a inibição do complexo I pode levar a um aumento na produção de ROS e/ou NRS que podem contribuir para injúria neuronal e para epileptogênese (FOLBERGROVA e KUNZ, 2012).

Deficiência no complexo I da cadeia respiratória na região CA3 do hipocampo também foi observada em pacientes com epilepsia do lobo temporal com focus epilético no

hipocampo e parahipocampo, sugerindo que a disfunção mitocondrial possa ocorrer apenas no foco da epilepsia e possa contribuir no mecanismo patológico alterando a excitabilidade e a vulnerabilidade neuronal neste tipo de epilepsia. Houve ainda estudos que mostraram um aumento na produção de radicais livres correlacionados com a morte celular neuronal na região CA3 durante a indução de convulsão através de modelos *in vitro*. De forma adicional, outro grupo de pesquisa estudou disfunção mitocondrial e dano estrutural hipocampal utilizando o modelo de indução de convulsão do ácido caínico e confirmaram a ocorrência de disfunção do complexo I da cadeia respiratória e dano hipocampal (KANG *et al.*, 2013).

Como já mencionado, há diversos modelos de indução de convulsão em animais. Estes modelos podem ser distribuídos em diferentes categorias, como, por exemplo, os modelos onde às convulsões ocorrem espontaneamente através da indução química ou elétrica, modelos que desenvolvem convulsões recorrentes (crônicos) ou aqueles que resultam em crises individuais (agudos). Há ainda aqueles que causam somente convulsões parciais e os que causam convulsões generalizadas, sendo que estas características serão cruciais para o objetivo do estudo em questão (LOSCHER, 2011). Entre estes modelos encontra-se o modelo do PTZ. O PTZ é um estimulante do sistema nervoso central que é amplamente utilizado para investigar fenômenos convulsivos e identificar substâncias farmacêuticas que possam alterar a suscetibilidade às convulsões. Este composto age predominantemente antagonizando a inibição do sistema gabaérgico via efeito no canal de cloreto do receptor GABA A ao se ligar ao sítio da picrotoxina (LOSCHER, 2009). A sua administração pode ser realizada via infusão intravenosa, intraperitoneal ou subcutânea. A dose a ser administrada pode ser calculada de acordo com a necessidade de desenvolver convulsão e o peso corporal do animal. Diferentes tipos de crises convulsivas podem ser obtidos com este tipo de teste. Geralmente a primeira crise que ocorre em poucos minutos em roedores e outras espécies de animais é a mioclonia, seguida por clonias e crises tônicas posteriores. A latência para a ocorrência das crises, a gravidade destas e sua duração podem ser parâmetros utilizados na análise de substâncias frente a este modelo, ou seja, substâncias pró-convulsivantes podem reduzir a latência para a ocorrência de crises convulsivas e aumentar a gravidade e a duração das mesmas (LOSCHER, 2009).

No âmbito dos objetivos deste trabalho, foi relatado o envolvimento da disfunção mitocondrial no mecanismo de indução de convulsão pelo PTZ, onde a administração de PTZ nas doses de 30, 45 e 60 mg/kg a ratos reduz as concentrações de ADP (adenosina difosfato) e ATP e o potencial de membrana mitocondrial (RAMBO *et al.*, 2013).

Ainda, em relação a dano mitocondrial e epilepsia, diferentes estudos também têm correlacionado à toxicidade induzida por FB1 com estes mecanismos mencionados. DOMIJAN e ABRAMOV (2011) estimaram o envolvimento da inibição da respiração mitocondrial e a desregulação da homeostase do cálcio na indução da toxicidade celular mediada pela FB1. Este grupo observou que a FB1 (0,5; 5 e 50 μM) aumentou de forma significativa a fluorescência do indicador de produção de radicais livres, dihidroetídio, em astrócitos e células de neuroblastoma. A fim de identificar a fonte de produção destes radicais livres, eles notaram que a inibição da NADPH oxidase não alterou a geração dos mesmos. Além disso, a produção das ROS pode ser dependente do potencial de membrana mitocondrial e por meio do uso de um desacoplador responsável por causar um colapso neste potencial e promover a oxidação do NADH perceberam que houve um bloqueio na produção de ROS estimulada pela FB1, o que sugere envolvimento mitocondrial na geração de estresse oxidativo. Ainda, foi investigada a influência desta micotoxina na cadeia de transporte de elétrons e perceberam uma redução na taxa de consumo de oxigênio em células de neuroblastoma após exposição a 5 μM de FB1. Em estudos com utilização de mitocôndria isolada a FB1 (5 μM) inibiu o estágio 3 de respiração mitocondrial na presença de 5 mM de glutamato/malato, mas não na presença de substratos para o estágio II, 5 mM succinato/5 μM rotenona. Da mesma forma, FB1 inibiu o estado IV da cadeia respiratória na presença de substratos para o complexo I, mas em meio contendo rotenona/succinato, o que sugere que a FB1 é capaz de inibir o complexo I da cadeia respiratória. Pode-se pesquisar ainda dentro do mesmo objetivo o potencial de membrana mitocondrial, um indicativo de integridade da mitocôndria e viu-se que FB1 (5 μM) induziu uma rápida despolarização, o que pode ser resultado da inibição do complexo I da cadeia respiratória.

Outro estudo do mesmo grupo, DOMIJAN *et al.* (2012) investigaram o impacto da FB1 em modelos de descargas epileptiformes *in vitro*. Com o objetivo de estimar o efeito da FB1 na sinalização neuronal mediada por cálcio induzida por glutamato, os pesquisadores incubaram culturas neuronais com FB1 (0,5 μM) e glutamato (5 μM e 100 μM). A co-exposição à micotoxina e ao glutamato resultou em um aumento na amplitude de cálcio quando comparado a exposição isolada de glutamato. No mesmo experimento, FB1 induziu despolarização mitocondrial. Este resultado pode ser explicado pela baixa captação de cálcio causado pela despolarização mitocondrial, que limitou a capacidade de captação de cálcio pela mitocôndria. A retirada de magnésio do meio extracelular também é conhecida por induzir oscilações no cálcio em culturas de neurônios. Essas oscilações são dependentes do receptor N-metil D-Aspartato (NMDA), uma vez que o bloqueio do receptor pelo magnésio

abole a oscilação de cálcio, resultando assim em neurotoxicidade. A fim de verificar o papel da FB1 nas alterações no cálcio por este modelo, neurônios foram pré-tratados com FB1 (0,5 μ M e 10 μ M). Foi demonstrado que a maior concentração foi responsável por causar tais oscilações, o que resultou na elevação do cálcio e da mesma forma que o trabalho anterior, despolarização mitocondrial, após exposição a baixas concentrações de magnésio, sendo que esta foi ainda elevada com a co-exposição a FB1 em iguais proporções nas diferentes concentrações.

Outro fator relevante entre os estudos com FB1 são as diferenças nos protocolos experimentais. A variabilidade das espécies usadas nos estudos (aves, mamíferos, roedores, células), e as particularidades de cada espécie em relação ao órgão mais afetado, além da sensibilidade entre os sexos, das doses e tempos de tratamentos diferentes dificultam a extrapolação de resultados de uma espécie/protocolo para outro, e desta forma impedem o estabelecimento de um mecanismo de ação tóxico ou de um possível tratamento.

Assim, há a necessidade de estudos que relacionem diferentes eventos no mesmo animal/protocolo, e a partir destes resultados será possível sugerir se a intoxicação por esta micotoxina pode estar relacionada com o desenvolvimento destes sintomas, bem como elucidar o mecanismo pelo qual eles ocorrem.

1.5. Justificativa

As fumonisinas são micotoxinas produzidas pelos fungos *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e outras espécies de *Fusarium*. Enquanto estas micotoxinas são encontradas em vários grãos e cereais, problemas de saúde relacionados a esta micotoxina estão mais exclusivamente relacionados ao consumo de milho ou produtos que contenham milho contaminado.

Os efeitos disso na saúde humana ainda são incertos, entretanto a intoxicação por fumonisinas está associada a risco de câncer de fígado e esôfago e defeitos no tubo neural em populações que consomem relativamente grandes quantidades de alimentos preparados a partir de milho contaminado.

A ocorrência de micotoxinas em alimentos e derivados não é um problema que se restringe aos países em desenvolvimento, alterando também o agronegócio de diferentes

países, interferindo ou impedindo as exportações, reduzindo a produção animal e agrícola e, em alguns países, afetando, também, a saúde humana. Cálculos confiáveis demonstram que aproximadamente 25% a 50% de todas as commodities produzidas no mundo, especialmente os alimentos básicos, estão de alguma forma contaminadas com micotoxinas. Nos países em desenvolvimento, o problema é ainda mais sério. Como os produtos de boa qualidade são normalmente exportados, aquelas commodities de qualidade inferior, as quais apresentam níveis de micotoxinas superiores aos permitidos nos países importadores, são vendidas e consumidas no mercado interno, com riscos evidentes para a saúde da população.

Deste modo, é evidente a necessidade de um estudo que investigue os tecidos alvo, incluindo o sistema nervoso central, da ação tóxica da FB1 e o mecanismo desta toxicidade para que deste modo possam ser estudadas estratégias que tornem possível a prevenção ou a minimização dos seus efeitos tóxicos nos casos onde já ocorreu a intoxicação, preservando a saúde humana e animal.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo geral

Este estudo tem por objetivo avaliar o efeito da exposição aguda à FB1 sobre as convulsões induzidas por PTZ, bem como estudar o possível mecanismo da sua ação tóxica no sistema nervoso central de camundongos.

1.6.2. Objetivos específicos

1.6.2.1. Avaliar o efeito da exposição aguda à FB1 na susceptibilidade às convulsões induzidas por PTZ, avaliando a latência para o desenvolvimento de mioclonias, bem como sobre o seu número;

1.6.2.2. Avaliar o efeito da exposição aguda à FB1 sobre a latência para o desenvolvimento de convulsões tônico-clônicas, bem como a sua duração em convulsões induzidas por PTZ;

1.6.2.3. Avaliar o efeito da exposição aguda à FB1 e o PTZ sobre a enzima Na^+ , K^+ ATPase em córtex cerebral e hipocampo de camundongos;

1.6.2.4. Avaliar o efeito da exposição aguda à FB1 e o PTZ sobre o potencial de membrana mitocondrial em córtex cerebral de camundongos;

1.6.2.5. Avaliar o efeito da exposição aguda à FB1 e o PTZ sobre atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória em córtex cerebral e hipocampo de camundongos.

2. MANUSCRITO

Fumonisin B1 facilitates seizures induced by pentylene-tetrazol: role of mitochondrial membrane potential and Na⁺,K⁺-ATPase activity

Alice Bertotto Poersch^a, Francielle Trombetta^a, Naiéli Schiefelbein Souto^b, Camilla de Oliveira Lima^a, Ana Cláudia Monteiro Braga^a, Fernando Dobrachinski^c, Leandro Rodrigo Ribeiro^a, Félix Antunes Soares^c, Michele Rechia Fighera^a, Luiz Fernando Freire Royes^{a,c}, Mauro Schneider Oliveira^{a,c}, Ana Flávia Furian^{a,b}*

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

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

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

*Corresponding author: Profa. Dra. Ana Flávia Furian

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos,
Universidade Federal de Santa Maria

Prédio 43, Sala 4217

97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.

PHONE: +55 55 3220 8254

E-mail: furian.anaflavia@gmail.com

Abstract

Fumonisin B1 (FB1) is a *Fusarium spp* mycotoxin reported as potential cause of neurotoxicity. Underlying mechanisms for FB1 toxicity have been related to inhibition of ceramide synthase (CS), leading accumulation of sphingosine (So) and sphinganine (Sa), which may cause mitochondrial dysfunction and oxidative stress. Therefore, this study aimed to investigate the FB1 role on seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) and the mechanism involved in this process. So, C57BL/6 mice were exposed to FB1 (8mg/kg i.p) or vehicle (1.6% dimethylsulfoxide (DMSO) + 0.9% NaCl) and elapsed 30 minutes injected with PTZ (30mg/kg i.p) or vehicle (0.9% NaCl). Behind 15 minutes observation, mice were euthanized and cerebral cortex and hippocampus were collected for analysis of Na⁺,K⁺-ATPase activity, membrane potential and mitochondrial complex I and II activities. FB1 reduced latency for myoclonic jerks and increased myoclonus number after PTZ administration. Even, Na⁺,K⁺-ATPase total activity as well as subunit α 1 of this enzyme were increased in cerebral cortex of animals treated with FB1, but in hippocampus it was reduced. FB1 elevated mitochondrial membrane potential in cerebral cortex however mitochondrial complex I and II activity weren't changed in both structures with this treatment. PTZ was able to enhance Na⁺,K⁺-ATPase α 2/ α 3 subunit activity in hippocampus. Thus, we showed that FB1 facilitates seizures induced by PTZ and suggest the involvement of mitochondrial membrane potential and Na⁺,K⁺-ATPase activity in this mechanism.

Key-words: Fumonisin B1, Na⁺,K⁺-ATPase, seizure, mitochondrial membrane potential, neurotoxicity, mitochondrial complex I.

1. Introduction

Fumonisin such as Fumonisin B1 (FB1) are mycotoxins produced by *Fusarium spp.* mould, mainly by *Fusarium verticilloides* and *Fusarium proliferatum*. The preferred substrate for the development of *Fusarium spp* is maize (Bulder et al. , 2012, Gelderblom et al. , 1988), and therefore these mycotoxins constitute a major public health risk since they can be found as food contaminants in a large number of products worldwide.

FB1 has similar structure to the sphingolipids bases sphingosine (So) and sphinganine (Sa), and it has been reported that this mycotoxin has the ability to inhibit the key enzyme in the metabolism of sphingolipids, ceramide synthase (CS). Inhibition of CS induces an accumulation of Sa and So and reduces the synthesis of sphingomyelin, cerebroside and gangliosides (Osuchowski and Sharma, 2005), which are crucial for several important biological processes, such as brain homeostasis, cell proliferation, DNA replication (Osuchowski et al., 2005, Riley et al., 2001, Voss et al., 2007). Additionally, interference with sphingolipid metabolism could lead to the development of neurotoxicity. In this line of view, some studies have suggested that FB1 elicits neurodegenerative processes (Waes et al. , 2005), probably related to axonal growth inhibition, disruption of myelin formation and deposition and delayed oligodendrocyte maturation (Monnet-Tschudi et al., 1999). FB1 also changes the levels of several neurotransmitter metabolites in mice and rats (Tsunoda et al. , 1998), and reduces electrophysiological activity in the rat neocortex after repeated daily exposition (Banczerowski-Pelyhe et al., 2002). Moreover, Domijan et al. (2012) reported that FB1 increases glutamate- and low magnesium-induced calcium signal, concomitant with mitochondrial membrane potential depolarization in cultured neurons, suggesting a possible relationship between this mycotoxin and the development of hyperexcitability.

Epilepsy is a neurological disorder characterized by chronic hyperexcitability and recurrent seizures that consist in synchronized discharges of large groups of neurons that interrupt normal brain function. Several studies indicate that epileptic seizures can occur as a presenting sign of mitochondrial dysfunction in the central nervous system, commonly characterized as myoclonus epilepsy (Folbergrova and Kunz, 2012).

Since maize is an important ingredient in many foods worldwide, and only a few studies have addressed the effect of food contaminants as a possible cause of neurological disorders such as hyperexcitability and seizures, the aim of the present study was to investigate the effect of acute exposition to FB1 on behavioral alterations induced by a subconvulsant dose of pentylenetetrazole (PTZ) in mice, as well as the potential underlying mechanisms.

2. Material and Methods

2.1. Animals and reagents

Adult male C57BL/6 mice (25–30 g) were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, 24 °C ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to water and food (Supra; Santa Maria, RS, Brazil). All experimental protocols were designed with the goal of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (106/2012).

FB1 (Cas. No. 116355-83-0; 99% purity) was obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). A stock solution of FB1 was prepared dissolving it in DMSO and further dilutions for experiments were done in 0.9% NaCl in such a way that the final DMSO concentration was 1.6 %.

2.2. Drug administration protocol

The effect of FB1 on seizure activity induced by PTZ was investigated by injecting FB1 (8 mg/kg, i.p.) or its vehicle (sterile saline solution – 0.9% NaCl + DMSO 1.6%, i.p.), 30 min before the injection a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg, i.p.) or its vehicle (sterile saline solution – 0.9% NaCl).

2.3. Behavioral seizure evaluation

Animals were video-monitored for 15 min after ptz administration for the appearance of myoclonic jerks and generalized seizures, according to (ferraro et al. , 1999). Accordingly, myoclonic jerks seizures are episodes characterized by typical partial clonic activity affecting the face, head, vibrissae, and forelimbs. Such myoclonic jerks events are short, typically lasting 1–2 s, and can occur either individually or in multiple discrete episodes before generalization and over time. Generalized convulsive episodes are characterized by generalized whole-body clonus involving all four limbs and tail, rearing, wild running and jumping, sudden loss of upright posture, and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation. The duration of generalized seizures was variable, but typically involved

behavioral changes lasting for 30–60 s, followed by a quiescent period. During the 15-min observation period, the latencies myoclonic jerks and generalized seizures, duration of generalized were measured. After the behavioral seizure evaluation, the mice were euthanized and cerebral cortex and hippocampus were collected for biochemical analysis.

2.4. Biochemical analysis

2.4.1. Na^+ , K^+ -ATPase activity measurements

The cerebral cortex and hippocampus was homogenized in ice-cold 30 mM Tris–HCl buffer (pH 7.40 for determination of Na^+ , K^+ -ATPase activity (Oliveira et al. , 2009). Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl_2 and 10 μg of protein in the presence or absence of ouabain, in a final volume of 350 μl . In order to investigate whether some Na^+ , K^+ -ATPase α isoform is selectively changed, we used a classical pharmacological approach, based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi et al. , 1999). We measured ouabain-sensitive ATPase activity using 3 μM (which inhibits Na^+ , K^+ -ATPase α_2/α_3) or 4 mM ouabain (which inhibits all isoforms). The reaction was initiated through addition of adenosine triphosphate (ATP) to a final concentration of 3 mM. After 30 min at 37° C, the reaction was stopped through the addition of 50 μl of 70 % (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used, and the reaction was linear with regard to protein and time. Appropriate controls were included in the assays to control for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified with the colorimetric method described by Wyse et al., (2000), using KH_2PO_4 as reference standard. Specific Na^+ , K^+ -ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

2.4.2. Mitochondrial isolation

Mitochondria were isolated by conventional differential centrifugation as described elsewhere (da-silva et al., 2004) with some modifications. After the end of protocol described above, the brain was rapidly removed to an ice-cold isolation buffer (0.32 M sucrose, 1 mM edta, 1 mM egta, and 10 mM tris-hcl, at pH 7.4) kept at 4 °C throughout the isolation procedure and brain structures (hippocampus and cerebral cortex) were then separated. The tissue was manually homogenized during two cycles of 10s in a teflon glass potter. The homogenate was

centrifuged at 1.330xg for 3 min in a hitachi himac scr20b rpr 20-2 rotor. The supernatant was carefully removed and centrifuged at 21,200xg for 10 min. The pellets obtained were re-suspended in buffer isolation with 15% percoll. The discontinuous density gradient was prepared manually by layering 3-ml fractions of the re-suspended pellet on two preformed layers consisting of 3.5 ml of 23% percoll above 3.5 ml of 40% percoll. Tubes were centrifuged for 5 min at 30,700xg with slow brake deceleration. The material equilibrating near the interface between the 23 and 40% percoll layers was gently diluted 1:4 with isolation buffer and then centrifuged at 16,700xg for 10 min. A firm pellet was obtained and gently re-suspended in the isolation buffer and supplemented with 0.2 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin. After centrifugation at 6,900xg for 10 min, the supernatant was rapidly decanted, and the pellet re-suspended in the same buffer using a fine teflon pestle. Protein was determined by the bradford (1976) method using bovine serum albumin as standard. This procedure yielded about 8 mg of protein per mice cortex and hippocampus.

All of the experiments with isolated mitochondria were carried out at 37 °c with continuous stirring in a buffer containing 10 mm tris-hcl, ph 7.4, 0.32 m mannitol, 8 mm inorganic phosphate, 4 mm mgcl₂, 0.08 mm edta, 1 mm egta and 0.2 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin.

2.1.1. Mitochondrial membrane potential ($\delta\psi_m$) determination

The mitochondrial $\delta\psi_m$ determination was estimated by fluorescence changes in safranin-o assayed according to (akerman and wikstrom, 1976). Briefly, the mitochondrial samples of brain structures (200 μ g protein/ml) were incubated with “isolation buffer iii”, safranin-o (10 μ m), and the respiratory substrates glutamate/malate (5 mm) and succinate (5 mm). The reaction was started with the mitochondria addition, and the medium was kept at constant stirring during the assay period. The fluorescence analysis was performed at 495 nm for excitation and 586 nm for emission, with slit widths of 5 nm. $\Delta\psi_m$ is presented as arbitrary fluorescence units per second (afu/s).

2.1.2. Mitochondrial complex i assay

The activity of complex i (nadh dehydrogenase) was assessed using a method described by (bottje et al. , 2002) with modifications. Briefly, the activity was measured by following the oxidation of nadh. Approximately 0.1 mg prot/ml of mitochondria was added to a solution containing 35 mm potassium phosphate buffer (ph 7.4) and 1.3 mm dcip in a final volume of 1 ml. The reaction was initiated with the addition of 0.15 mm nadh.

Absorbance at 600 nm was monitored for 2 min to follow the rate of oxidation of nadh, and the activity was determined using an extinction coefficient of $6.22 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. After thawing, the mitochondria were found to be completely permeable to nadh.

2.1.1. Mitochondrial complex ii assay

The activity of complex ii (succinate: ubiquinone oxidoreductase) was determined following the reduction of dcip by succinate (fischer et al., 1985). The reaction mixture consisted of 50 mm potassium phosphate buffer ph 7.0, 1 mm KCN, 0.05 mm dcip, 2mg/ml rotenone, 16 mm succinate and 0.1mg prot/ml of mitochondrial. Absorbance changes were followed at 600 nm, using an extinction coefficient of $19.1 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for dichlorophenolindophenol.

2.1.2. Protein determination

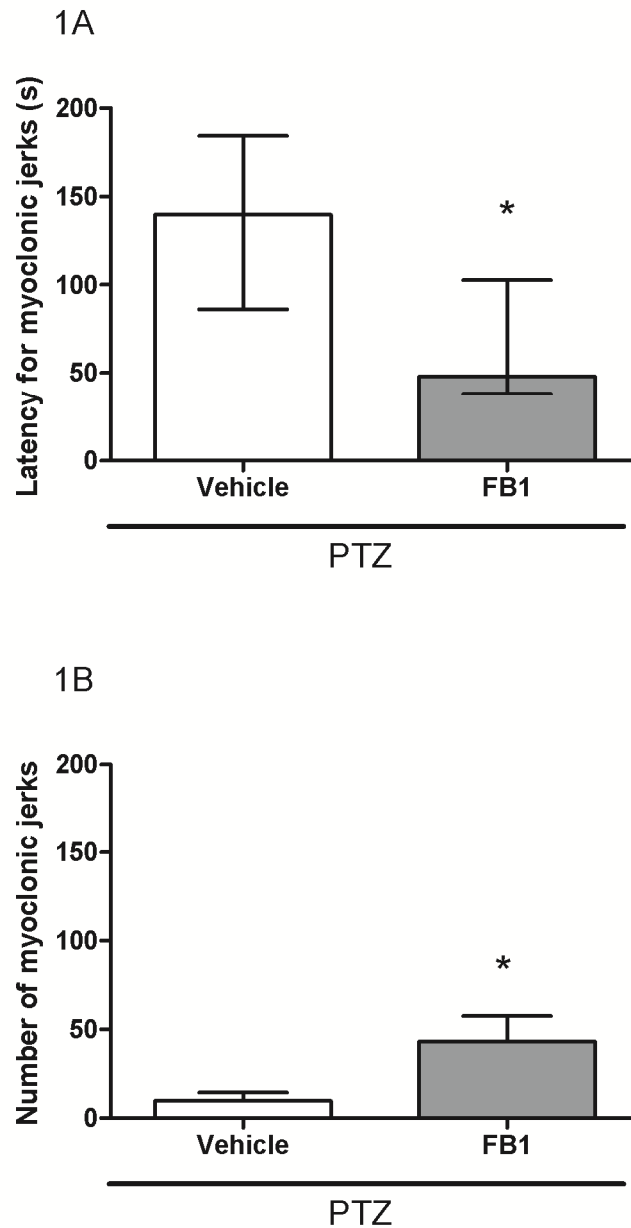
Protein content was measured colorimetrically by the method of (bradford, 1976) using bovine serum albumin (1 mg/ml) as standard.

2.1.3. Statistical analyses

Latencies to myoclonic jerks and generalized seizures were analyzed by the Mann-Whitney test and presented as median and interquartile ranges. Number of myoclonic jerks was analyzed by the Student's t test. Biochemical data were analyzed by parametric two-way analysis of variance (ANOVA) and expressed as mean and standard error of the mean. A probability of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

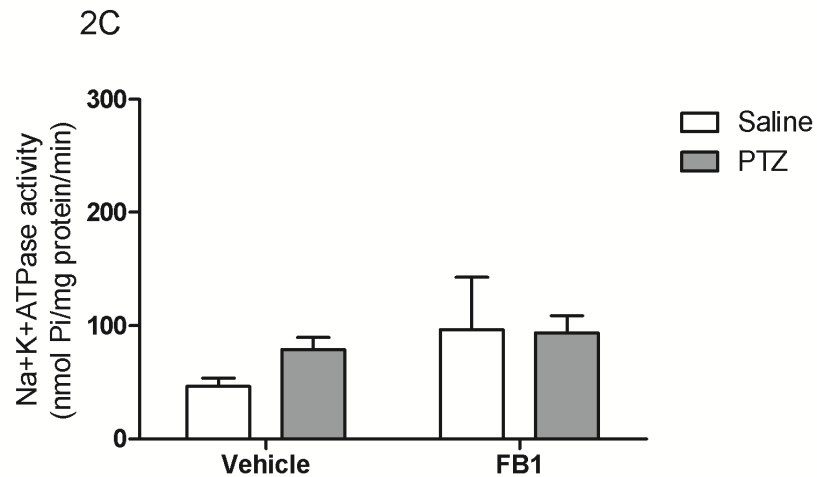
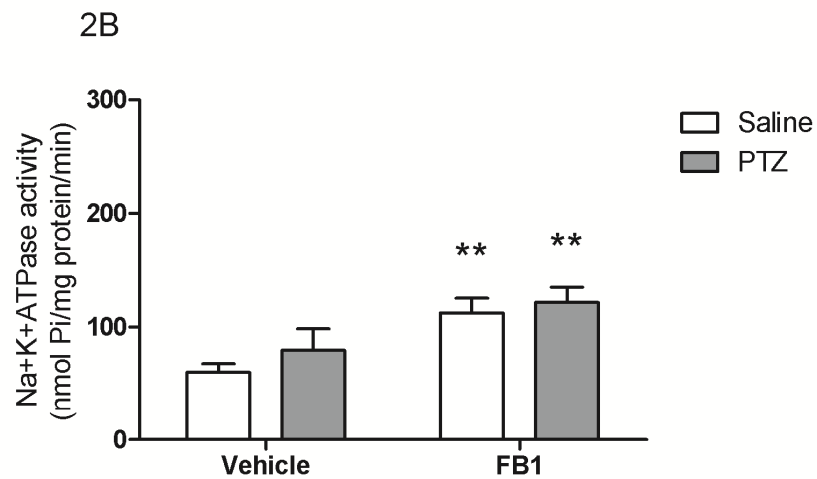
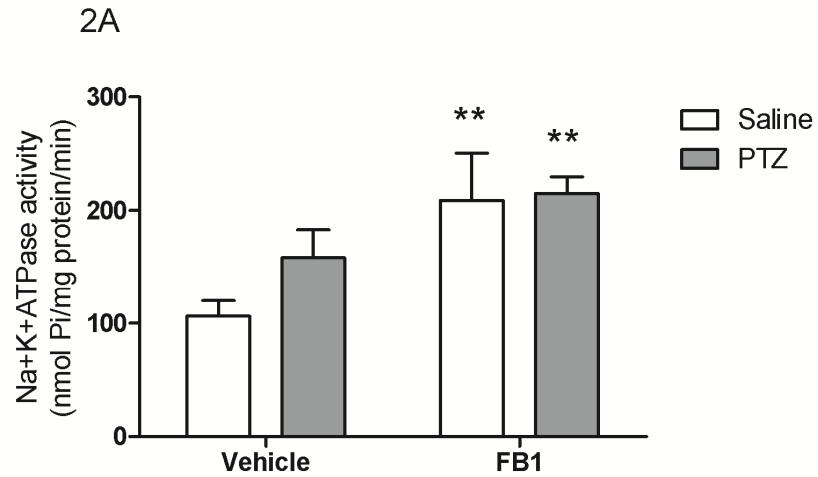
3. Results

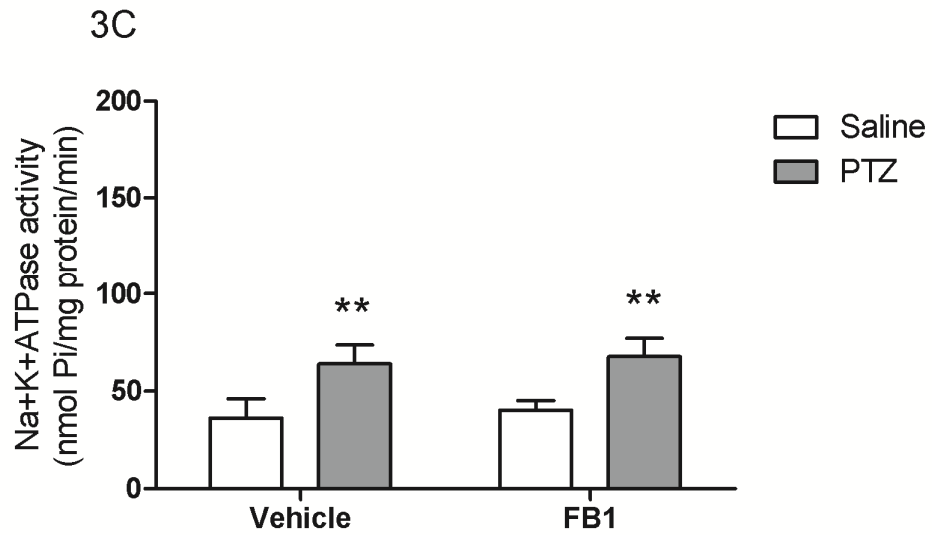
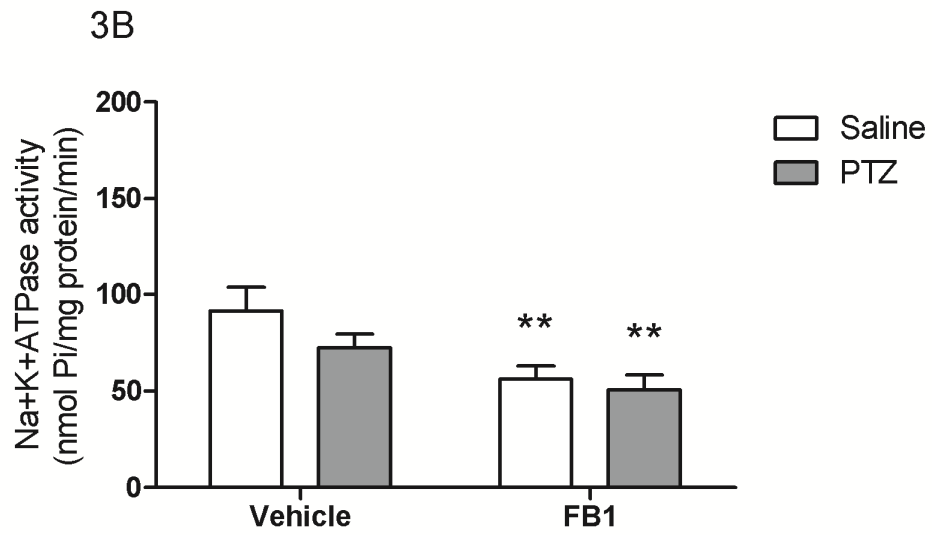
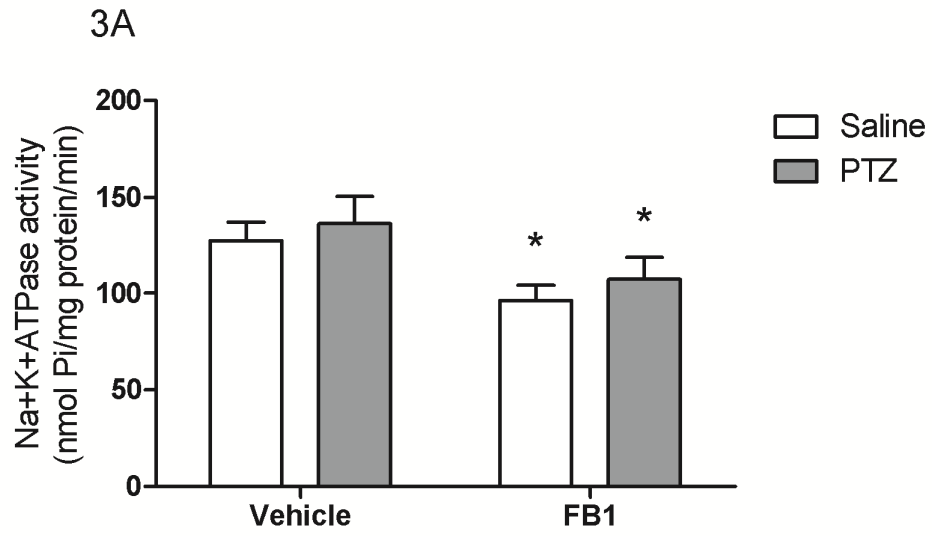
In order to investigate the potential excitatory effects of an acute exposition to FB1 (8 mg/kg, i.p.) in mice we video-monitored the animals for the appearance of myoclonic jerks and generalized seizures after a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg, i.p.). Statistical analyses revealed that FB1 decreased the latency to myoclonic jerks ($U(15)=13.00$; $P=0.0274$, Fig. 1A) and increased their number ($t(15)=2.157$; $P=0.0476$, Fig. 1B). Latency to or tonic-clonic seizure duration was not modified by FB1 ($U(15) =12.50$; $P=0.200$ - data not shown).



Since FB1 facilitates the development of seizures induced by PTZ, we decided to study the potential underlying mechanisms. In this context, we found that FB1 increased total Na^+ , K^+ -ATPase and $\alpha 1$ subunit activity in cerebral cortex, without concomitant changes in $\alpha 2/\alpha 3$ subunit activity ($F(1,20)=10.04$; $P=0.0048$, Fig. 2A; $F(1,20)=9.59$; $P=0.0057$, Fig. 2B; $F(1,20)=0.6262$; $P=0.4380$, respectively - Fig. 2C). FB1 exposure reduced total Na^+ , K^+ -ATPase and $\alpha 1$ subunit activity in the hippocampus, without altering $\alpha 2/\alpha 3$ subunit activity ($F(1,32)=6.945$; $P=0.0128$, Fig. 3A; $F(1,32)=10.75$; $P=0.0025$, Fig. 3B; $F(1,33)=0.0001661$; $P=0.9898$, Fig. 3C). PTZ was not able to modify enzyme activity in the cerebral cortex ($F(1,32)=0.8265$; $P=0.3741$, Fig. 2A; $F(1,20)=0.1167$; $P=0.7362$, Fig. 2B;

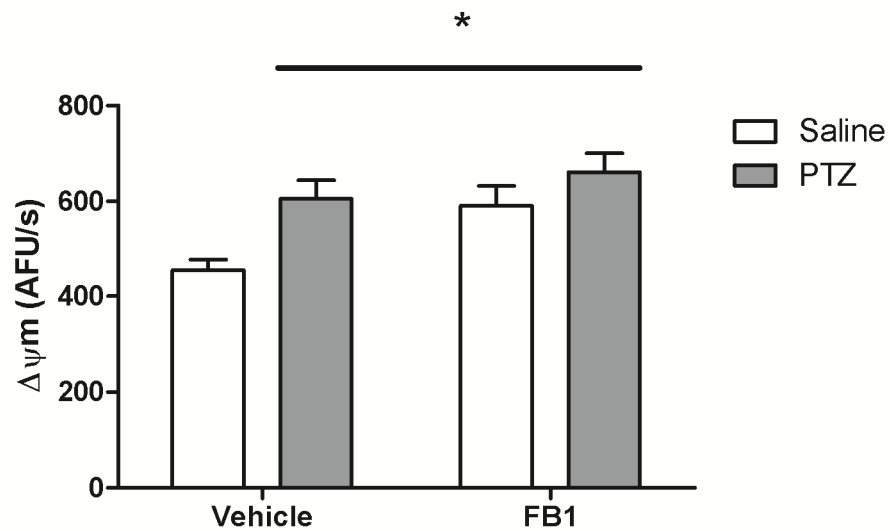
F(1,20)=0.6262; P=0.4380, Fig. 2C), but increased subunit $\alpha 2/\alpha 3$ activity in the hippocampus (F(1,33)= 9.255; P=0.0046, Fig. 3C) without altering the total and $\alpha 1$ subunit activities (F(1,32)= 0.009211; P=92.41, Fig. 3A; F(1,32)= 0.6122; P=0.4397, Fig. 3B).

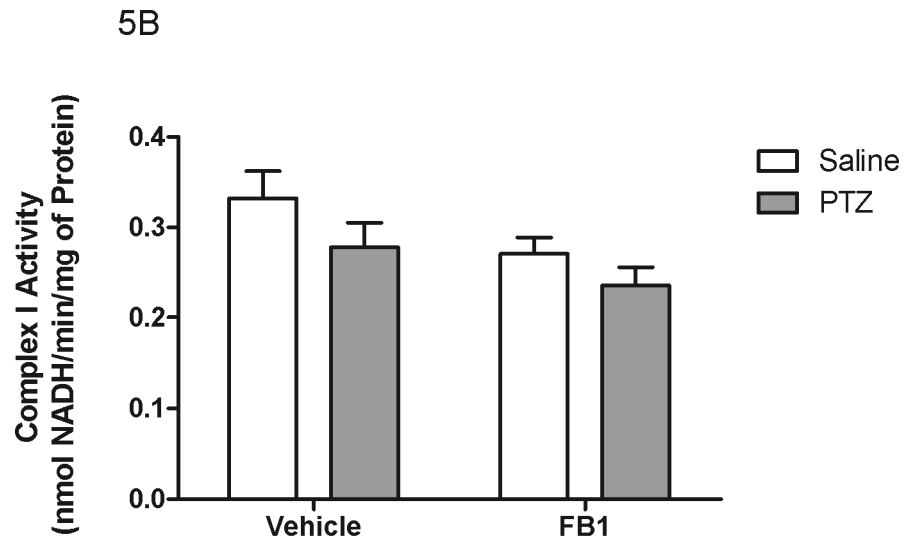
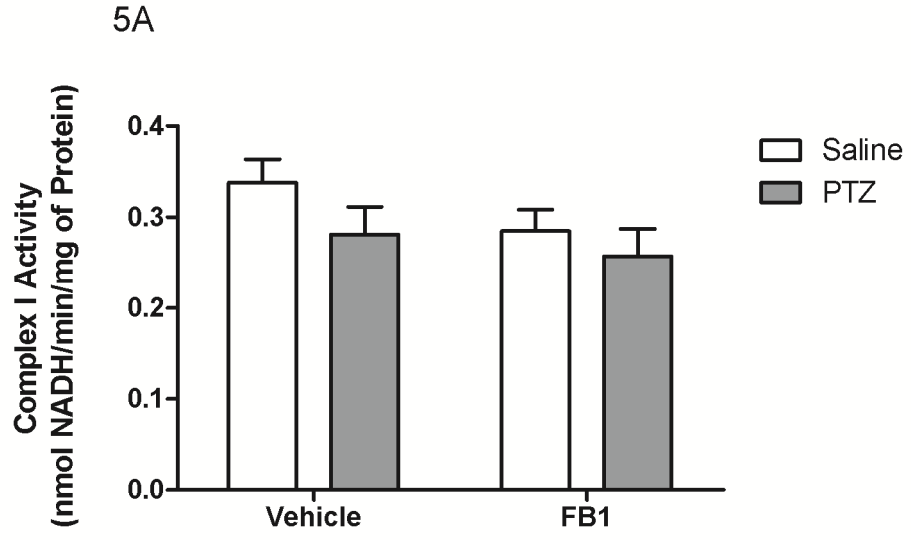


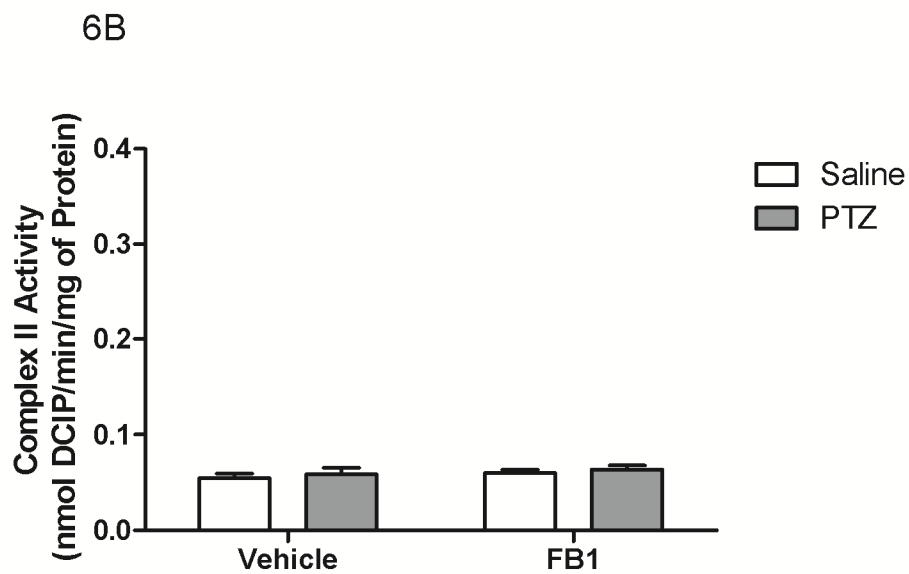
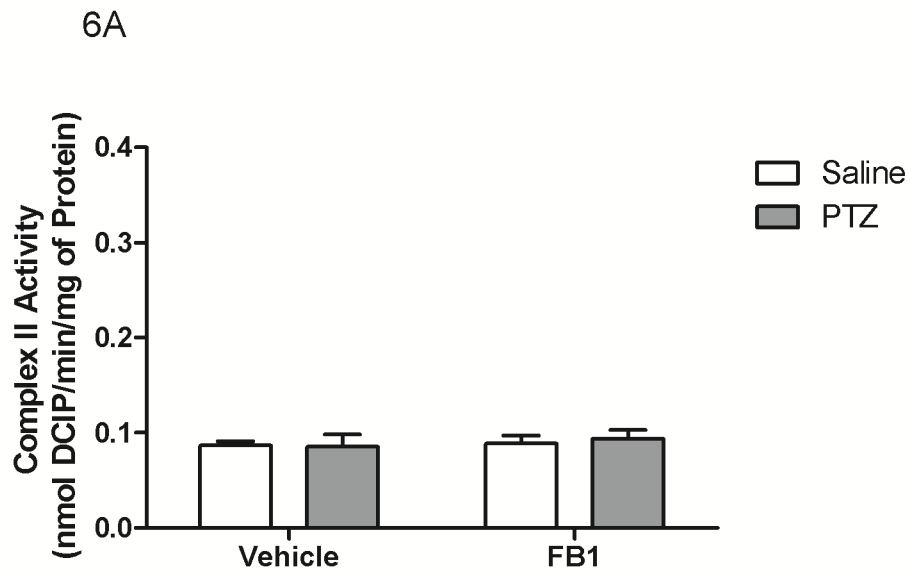


Regarding the involvement of mitochondrial dysfunction in toxicity mechanism of FB1, we found an increase of mitochondrial membrane potential in cerebral cortex of mice exposed to FB1 or PTZ ($F(1,12)= 6.777$, $P=0.0231$ and $F(1,12)=9.001$; $P=0.0111$, respectively, Fig. 4). Their combination did not result in an additive or synergic effect ($F(1,12)= 1.204$; $P=0.2940$). In addition, no changes in the activities of mitochondrial complex I or II were found after exposition to FB1 or PTZ ($F(1,12)=0.2819$; $P=0.6051$, Fig. 5A; ($F(1,12)= 0.1469$; $P= 0.7082$ Fig. 5B; ($F(1,12)= 0.1364$; $P=0.4380$, Fig. 6A; ($F(1,12)= 0.0005510$; $P=0.9817$, Fig. 6B).

Figure 4







3. Discussion

FB1 is a mycotoxin produced mainly by fungi of *Fusarium* species. This fusariotoxin occurs in cereals, mainly in maize, which is an important ingredient in many foods worldwide. In view of that few studies have investigated the effect of food contaminants as a possible cause of chronicle neurological disorders such as seizure susceptibility in the present study we investigated the effects of an acute exposure to FB1 in alterations induced by a subconvulsant dose of PTZ.

We found that acute exposition to FB1 to adult male C57BL/6 mice facilitates the occurrence of PTZ-induced seizures, since a single injection of this mycotoxin reduced the latency to myoclonic jerks as well as increased the number of such myoclonic events. There are few studies addressing the effect of FB1 on seizure models *in vivo*. Accordingly, Banczerowski-Pelyhe et al. (2002) exposed male Wistar rats to a diet containing 30 mg/kg body weight/day of FB1 for 5 days and then evaluated the amplitude of auditory evoked potentials *in vivo* and the susceptibility of sensory cortex slices to an excitatory stimulus (4-aminopyridine, 4-AP). They found decreased amplitude of auditory evoked potentials as well as high as 60%. In addition, in slices from fumonisin-treated animals the maximal amplitude of electrically-evoked extracellular responses was smaller than in control slices, and the response to bath application of 4-AP was less pronounced in terms of frequency and duration of epileptiform discharges. Although these results may indicate decreased excitability, they may also be the reflect of damaged signal transmission secondary to systemic adverse changes, such as liver and renal toxicity, or nutritional deficiency elicited by repeated FB1 exposure (Banczerowski-Pelyhe, Vilagi, 2002). In this context, our results indicate that one of the primary effects of FB1 is increased hyperexcitability, since we found an increase in seizure susceptibility as early as 30 minutes after a single administration of this mycotoxin. Following repeated exposure, this could lead to functional alterations in the central nervous system, including impaired neurotransmission and performance of neural networks.

In this line of view, mitochondrial dysfunction is a consequence of many neurological insults such trauma, infections and could be a risk factor for the development of epilepsy (Liang et al., 2012). Since mitochondria is the main energy source of the cell, its primary physiological function is to generate adenosine triphosphate through oxidative phosphorylation via the electron transport chain (Bindoff and Engelsen, 2012). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) is an important step in energy production and is an indicator of mitochondrial integrity. In order to investigate the cellular mechanism of FB1 toxicity, we evaluated some mitochondrial parameters in animals treated with FB1 and submitted to a subconvulsant dose of PTZ. Our results showed that FB1 and PTZ were able to increase the $\Delta\Psi_m$ as compared to control group. These results reinforce that FB1 inhibits mitochondrial respiration (Domijan and Abramov, 2011), complex I inhibition (Domijan and Abramov, 2011, Domijan, Kovac, 2012), calcium overload and ROS production (Domijan and Abramov, 2011, Domijan, Kovac, 2012, Nicholls, 2005) observed in cellular culture of neurons and astrocytes exposed to FB1.

In addition, it has been demonstrated that exposition of FB1 could change calcium influx and so, modify functions of the basal activity of enzymes, such as Na^+ , K^+ -ATPase. In this study, we analyzed Na^+ , K^+ -ATPase activity in cerebral cortex and hippocampus of mice exposed to FB1, and in cerebral cortex we showed an enhanced total Na^+ , K^+ -ATPase and $\alpha 1$ subunit activity. This result agrees with the increased $\Delta\Psi_m$, since Na^+ , K^+ -ATPase uses ATP as energy for transports 3 Na^+ ions into the extracellular medium and 2 K^+ ions to the intracellular environment (Benarroch, 2011, Jorgensen et al., 2003). The increased Na^+ , K^+ -ATPase activity requires increased $\Delta\Psi_m$ for maintaining their functionality and could represent an initial signal of neurotoxicity. The augmented exchange of ions between the intracellular and extracellular media is necessary to maintain the gradient of Na^+ and K^+ which is of fundamental importance for maintaining neuronal excitability, conduction of the action potential and the system secondary transport involving synaptic uptake of neurotransmitters and the regulation of cell volume (Benarroch, 2011, Jorgensen, Hakansson, 2003). However, PTZ doesn't change enzyme activity in cerebral cortex. This fact holds opposing views from other studies that shows an inhibition of enzyme activity after PTZ administration (Rambo et al., 2009, Silva et al., 2011, Souza et al., 2009). So due to subconvulsant dose used in the study it cannot by itself trigger a seizure.

On the other hand, we showed decreased total Na^+ , K^+ -ATPase and $\alpha 1$ subunit activity in hippocampus of the same animals, accompanied by an increased $\alpha 2/\alpha 3$ subunits after administration of PTZ. Previous studies have indicated a connection between inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity, facilitation of development of seizures induced by PTZ and oxidative stress. Silva, Hoffmann, (2011) demonstrated that treadmill physical training protected against behavioral and electrographical seizures elicited by subthreshold dose of PTZ and also protected against the Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition, and concomitant increase in the lipoperoxidation in site and peri-contusional cortical tissue. Rambo, Ribeiro, (2009) shows that creatine supplementation abrogated the PTZ-elicited increase in lipoperoxidation and protein carbonylation, as well as prevented PTZ-induced decrease in hippocampal Na^+ , K^+ -ATPase activity.

In summary, we concluded that acute exposition to FB1 have a potential neurotoxic effect demonstrated by facilitation of seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ. Possibly, the underlying mechanisms are related to mitochondrial membrane potential and Na^+ , K^+ -ATPase activity. However, more studies are necessary to confirm these effects as well the investigation of additional mechanisms involved in this process.

Acknowledgements

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (grants #1879-25.51/13-6). L.R.R, F.A.S., L.F.F.R., M.R.F., M.S.O., A.F.F. are the recipients of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) fellowships; A.B.P. is the recipient of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship and F.T is the recipient of FAPERGS fellowship. Authors thanks for Prof Dr Carlos Fernando de Mello for providing laboratory facilities.

Conflict of Interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Figure Legends

Figure 1: Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) on seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg i.p.). Fig. 1A represents the latency for myoclonic jerks and Fig.1B the number of myoclonic jerks. Data are mean + S.E.M for number of myoclonic jerks, and median and interquartile range to latency of myoclonic jerk, n =4-9 animals in each group. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with control group.

Figure 2: Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na^+, K^+ -ATPase (2A), $\alpha 1$ (2B) and $\alpha 2/\alpha 3$ (2C) subunit in cerebral cortex of mice. Data are mean + S.E.M, n=5-7 animals in each group. ** Indicates a significant difference ($P < 0.01$) compared with vehicle group.

Figure 3: Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na^+, K^+ -ATPase (3A), $\alpha 1$ (3B) and $\alpha 2/\alpha 3$ (3C) subunit in hippocampus of mice. Data are mean + S.E.M, n =5-7 animals in each group. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) and ** Indicates a significant difference ($P < 0.01$) compared with vehicle group.

Figure 4: Effect of exposure to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on mitochondrial membrane potential of cerebral cortex of mice. Data are mean + S.E.M, n=4 animals in each group. * Indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared with vehicle group.

Figure 5: Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on mitochondrial complex I activity of cerebral cortex (5A) and hippocampus (5B) in mice. Data are mean + S.E.M n=4 animals in each group.

Figure 6: Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on mitochondrial complex II activity of cerebral cortex (6A) and hippocampus (6B) in mice Data are mean + S.E.M n=4 animals in each group.

4. References

Akerman KE, Wikstrom MK. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett.* 1976;68:191-7. doi:0014-5793(76)80434-6 [pii]

Banczerowski-Pelyhe I, Vilagi I, Detri L, Doczi J, Kovacs F, Kukorelli T. In vivo and in vitro electrophysiological monitoring of rat neocortical activity after dietary fumonisin exposure. *Mycopathologia.* 2002;153:149-56.

Benarroch EE. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology.* 2011;76:287-93. doi:10.1212/WNL.0b013e3182074c2f76/3/287 [pii] Bindoff LA, Engelsen BA. Mitochondrial diseases and epilepsy. *Epilepsia.* 2012;53 Suppl 4:92-7. doi:10.1111/j.1528-1167.2012.03618.x

Bottje W, Tang ZX, Iqbal M, Cawthon D, Okimoto R, Wing T, et al. Association of mitochondrial function with feed efficiency within a single genetic line of male broilers. *Poultry Sci.* 2002;81:546-55.

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

Bulder AS, Arcella D, Bolger M, Carrington C, . Kpodo K, Resnik S, et al. Safety evaluation of certain food additives and contaminants/ prepared by the Seventy-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). In: Organization IWH, editor. FUMONISINS (addendum). Geneva 2012.

da-Silva WS, Gomez-Puyou A, de Gomez-Puyou MT, Moreno-Sanchez R, De Felice FG, de Meis L, et al. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant Defense - Steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry.* 2004;279:39846-55. doi:DOI 10.1074/jbc.M403835200

Domijan AM, Abramov AY. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis--implication to mechanism of cell toxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43:897-904. doi:10.1016/j.biocel.2011.03.003 S1357-2725(11)00069-0 [pii]

Domijan AM, Kovac S, Abramov AY. Impact of fumonisin B1 on glutamate toxicity and low magnesium-induced seizure activity in neuronal primary culture. *Neuroscience*. 2012;202:10-6.

Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, et al. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci*. 1999;19:6733-9. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.12.005 S0306-4522(11)01385-6 [pii]

Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JM, Veerkamp JH, Stadhouders AM, et al. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta*. 1985;153:23-36.

Folbergrova J, Kunz WS. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. *Mitochondrion*. 2012;12:35-40. doi:10.1016/j.mito.2011.04.004 S1567-7249(11)00185-1 [pii] Gelderblom WC, Jaskiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, et al. Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*. 1988;54:1806-11.

Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol*. 2003;65:817-49. doi:10.1146/annurev.physiol.65.092101.142558 092101.142558 [pii]

Liang LP, Waldbaum S, Rowley S, Huang TT, Day BJ, Patel M. Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: attenuation by a lipophilic metalloporphyrin. *Neurobiol Dis*. 2012;45:1068-76. doi:10.1016/j.nbd.2011.12.025 S0969-9961(11)00400-1 [pii]

Monnet-Tschudi F, Zurich MG, Sorg O, Matthieu JM, Honegger P, Schilter B. The naturally occurring food mycotoxin fumonisin B1 impairs myelin formation in aggregating brain cell culture. *Neurotoxicology*. 1999;20:41-8

Nicholls DG. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*. 2005;38:311-7.

Nishi A, Fisone G, Snyder GL, Dulubova I, Aperia A, Nairn AC, et al. Regulation of Na⁺, K⁺-ATPase isoforms in rat neostriatum by dopamine and protein kinase C. *J Neurochem.* 1999;73:1492-501. doi:S0143-4160(05)00096-5 [pii] 10.1016/j.cec.2005.06.011

Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem.* 2009;109:416-26. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05961.x JNC5961 [pii]

Osuchowski MF, Edwards GL, Sharma RP. Fumonisin B-1-induced neurodegeneration in mice after intracerebroventricular infusion is concurrent with disruption of sphingolipid metabolism and activation of proinflammatory signaling. *Neurotoxicology.* 2005;26:211-21. doi:DOI 10.1016/j.neuro.2004.10.001

Osuchowski MF, Sharma RP. Fumonisin B-1 induces necrotic cell death in BV-2 cells and murine cultured astrocytes and is antiproliferative in BV-2 cells while N2A cells and primary cortical neurons are resistant. *Neurotoxicology.* 2005;26:981-92. doi:DOI 10.1016/j.neuro.2005.05.001

Rambo LM, Ribeiro LR, Oliveira MS, Furian AF, Lima FD, Souza MA, et al. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylentetrazol-induced seizures. *Neurochem Int.* 2009;55:333-40. doi:10.1016/j.neuint.2009.04.007 S0197-0186(09)00134-X [pii]

Riley RT, Enongene E, Voss KA, Norred WP, Meredith FI, Sharma RP, et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ Health Persp.* 2001;109:301-8. doi:Doi 10.2307/3435022

Silva LF, Hoffmann MS, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Furian AF, et al. The involvement of Na⁺, K⁺-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury. *J Neurol Sci.* 2011;308:35-40. doi:10.1016/j.jns.2011.06.030 S0022-510X(11)00365-0 [pii]

Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, et al. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia*. 2009;50:811-23. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01908.x EPI1908 [pii]

Tsunoda M, Sharma RP, Riley RT. Early fumonisin B1 toxicity in relation to disrupted sphingolipid metabolism in male BALB/c mice. *J Biochem Mol Toxicol*. 1998;12:281-9. doi:10.1002/(SICI)1099-0461(1998)12:5<281::AID-JBT4>3.0.CO;2-H [pii]

Voss KA, Smith GW, Haschek WM. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*. 2007;137:299-325. doi:DOI 10.1016/j.anifeedsci.2007.06.007

Waes JG, Starr L, Maddox J, Aleman F, Voss KA, Wilberding J, et al. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: Mechanisms in an in vivo mouse model. *Birth Defects Res A*. 2005;73:487-97. doi:Doi 10.1002/Bdra.20148

Wyse AT, Streck EL, Barros SV, Brusque AM, Zugno AI, Wajner M. Methylmalonate administration decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity in cerebral cortex of rats. *Neuroreport*. 2000;11:2331-4.

3. CONCLUSÕES

3.1. Conclusão Geral

A FB1 facilitou o desenvolvimento de convulsões induzidas por PTZ e o mecanismo envolvido nesse efeito está relacionado ao potencial de membrana mitocondrial e a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase no sistema nervoso central de camundongos.

3.2. Conclusões específicas

3.2.1. A exposição aguda à FB1 reduziu a latência para o desenvolvimento de mioclonias induzidas por PTZ, bem como aumentou o seu número;

3.2.2. A exposição aguda à FB1 não alterou a latência para o desenvolvimento de convulsões tônico-clônicas, bem como a duração das mesmas nas convulsões induzidas por PTZ;

3.2.3. A exposição aguda à FB1 aumentou a atividade total e da subunidade $\alpha 1$ da enzima Na^+ , K^+ ATPase em córtex cerebral e reduziu a atividade nas mesmas no hipocampo de camundongos. Porém, o PTZ somente foi capaz de aumentar a atividade da subunidade $\alpha 2/\alpha 3$ no hipocampo dos mesmos animais;

3.2.4. A exposição aguda à FB1 e ao PTZ elevou o potencial de membrana mitocondrial em córtex cerebral de camundongos expostos agudamente a FB1 e PTZ;

3.2.5. A atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória não foram alterados em córtex cerebral e hipocampo de camundongos expostos agudamente a FB1 e PTZ;

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL NOUR, A. M. et al. Folate receptor and human reduced folate carrier expression in HepG2 cell line exposed to fumonisin B1 and folate deficiency. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 11, p. 2291-7, Nov 2007. ISSN 1460-2180 (Electronic) 0143-3334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17615259> >.

ABRAMOV, A. Y.; DUCHEN, M. R. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. **Biochim Biophys Acta**, v. 1777, n. 7-8, p. 953-64, Jul-Aug 2008. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18471431> >.

AGUIAR, C. C. et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 795259, 2012. ISSN 1942-0994 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22848783> >.

ANDRADE, A. N. Micotoxinas: Importância na alimentação. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, n. 2, p. 161 – 163, 2004.

ARANHA, M. Epilepsia. **ICC-Instituto de Ciências Cognitivas**, p. 1-4, 2001.

BANCZEROWSKI-PELYHE, I. et al. In vivo and in vitro electrophysiological monitoring of rat neocortical activity after dietary fumonisin exposure. **Mycopathologia**, v. 153, n. 3, p. 149-56, 2002. ISSN 0301-486X (Print) 0301-486X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11998878> >.

BARRES, B. A. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron**, v. 60, n. 3, p. 430-40, Nov 6 2008. ISSN 1097-4199 (Electronic) 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995817> >.

BAY, V.; BUTT, A. M. Relationship between glial potassium regulation and axon excitability: a role for glial Kir4.1 channels. **Glia**, v. 60, n. 4, p. 651-60, Apr 2012. ISSN 1098-1136 (Electronic) 0894-1491 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290828> >.

BENARROCH, E. E. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v. 76, n. 3, p. 287-93, Jan 18 2011. ISSN 1526-632X (Electronic) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242497> >.

BENNETT, J. W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 3, p. 497-516, Jul 2003. ISSN 0893-8512 (Print)
0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12857779> >.

BETINA, V. **Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification**. Amsterdam: Elsevier, 1984. 528.

BOERMANS, H. J.; LEUNG, M. C. Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. **Int J Food Microbiol**, v. 119, n. 1-2, p. 95-102, Oct 20 2007. ISSN 0168-1605 (Print)
0168-1605 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17889389> >.

BONDY, G. et al. Toxicity of fumonisin B1 administered intraperitoneally to male Sprague-Dawley rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 653-65, Aug 1995. ISSN 0278-6915 (Print)
0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7672738> >.

BUCCI, T. J.; HANSEN, D. K.; LABORDE, J. B. Leukoencephalomalacia and hemorrhage in the brain of rabbits gavaged with mycotoxin fumonisin B1. **Nat Toxins**, v. 4, n. 1, p. 51-2, 1996. ISSN 1056-9014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8680754> >.

BUCCI, T. J. et al. Renal effects of fumonisin mycotoxins in animals. **Toxicologic Pathology**, v. 26, n. 1, p. 160-4, Jan-Feb 1998. ISSN 0192-6233 (Print)
0192-6233 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9502399> >.

BUCCOLIERO, R.; FUTERMAN, A. H. The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function. **Pharmacol Res**, v. 47, n. 5, p. 409-19, May 2003. ISSN 1043-6618 (Print)
1043-6618 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676515> >.

BURROUGHS, M. et al. Bacterial components and the pathophysiology of injury to the blood-brain barrier: does cell wall add to the effects of endotoxin in gram-negative meningitis? **J Infect Dis**, v. 165 Suppl 1, p. S82-5, Jun 1992. ISSN 0022-1899 (Print)
0022-1899 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588187> >.

CALDAS, E. D. S., S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ochratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Ann Intern Med**, v. 111, n. 11, p. 918-31, Dec 1 1989. ISSN 0003-4819 (Print)
0003-4819 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2683923> >.

COULOMBE, R. A., JR. Biological action of mycotoxins. **J Dairy Sci**, v. 76, n. 3, p. 880-91, Mar 1993. ISSN 0022-0302 (Print)
0022-0302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463495> >.

CREMER, C. M. et al. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 490-9, Sep 29 2009. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19345722 >.

DOMIJAN, A. M.; ABRAMOV, A. Y. Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis--implication to mechanism of cell toxicity. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 6, p. 897-904, Jun 2011. ISSN 1878-5875 (Electronic)
1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397036> >.

DOMIJAN, A. M.; KOVAC, S.; ABRAMOV, A. Y. Impact of Fumonisin B-1 on Glutamate Toxicity and Low Magnesium-Induced Seizure Activity in Neuronal Primary Culture. **Neuroscience**, v. 202, p. 10-16, Jan 27 2012. ISSN 0306-4522. Disponível em: < <Go to ISI>://0002999080000002 >.

ENGEL JR, J.; PEDLEY, T. A. What is Epilepsy? In: (Ed.). **Epilepsy A Comprehensive Textbook**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008. p. 1-7.

EVANS, S. J.; JONES, J. V.; LEVI, A. J. Reduction in external K causes increased action potential shortening in ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. **J Hypertens**, v. 15, n. 6, p. 659-66, Jun 1997. ISSN 0263-6352 (Print)
0263-6352 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218186> >.

FERNANDEZ-SURUMAY, G. et al. Fumonisin B-glucose reaction products are less toxic when fed to swine. **J Agric Food Chem**, v. 53, n. 10, p. 4264-71, May 18 2005. ISSN 0021-8561 (Print)
0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15884870> >.

FOLBERGROVA, J.; KUNZ, W. S. Mitochondrial dysfunction in epilepsy. **Mitochondrion**, v. 12, n. 1, p. 35-40, Jan 2012. ISSN 1872-8278 (Electronic)
1567-7249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21530687> >.

FREIRE, F. D. C. O. et al. **Micotoxinas: Importância na Alimentação e na Saúde Humana e Animal**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 48.

FRISVAD, J. C. S., R. A. IN: ARORA, D.K., MUKERJII, K.G., MARTH, E.H. **Food and Feeds**. New York: Marcel Dekker, 1992.

GABY, A. R. Natural approaches to epilepsy. **Altern Med Rev**, v. 12, n. 1, p. 9-24, Mar 2007. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17397265 >.

GELDERBLOM, W. C. et al. Cancer promoting potential of different strains of *Fusarium moniliforme* in a short-term cancer initiation/promotion assay. **Carcinogenesis**, v. 9, n. 8, p. 1405-9, Aug 1988. ISSN 0143-3334 (Print) 0143-3334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2900086> >.

GELDERBLOM, W. C. et al. Effect of fumonisin B1 on protein and lipid synthesis in primary rat hepatocytes. **Food Chem Toxicol**, v. 34, n. 4, p. 361-9, Apr 1996. ISSN 0278-6915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641662> >.

GELINEAU-VAN WAES, J. et al. Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: mechanisms in an in vivo mouse model. **Birth Defects Res A Clin Mol Teratol**, v. 73, n. 7, p. 487-97, Jul 2005. ISSN 1542-0752 (Print) 1542-0752 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15959874> >.

GLITSCH, H. G. Electrophysiology of the sodium-potassium-ATPase in cardiac cells. **Physiol Rev**, v. 81, n. 4, p. 1791-826, Oct 2001. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11581502> >.

GOEL, S. et al. Effects of *Fusarium moniliforme* isolates on tissue and serum sphingolipid concentrations in horses. **Vet Hum Toxicol**, v. 38, n. 4, p. 265-70, Aug 1996. ISSN 0145-6296 (Print) 0145-6296 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8829343> >.

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

HAREL, R.; FUTERMAN, A. H. Inhibition of Sphingolipid Synthesis Affects Axonal Outgrowth in Cultured Hippocampal-Neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 19, p. 14476-14481, Jul 5 1993. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://A1993LJ82500098 >.

HARRISON, L. R. et al. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. **J Vet Diagn Invest**, v. 2, n. 3, p. 217-21, Jul 1990. ISSN 1040-6387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2094448> >.

HASSAN, A. M. et al. *Aquilegia vulgaris* L. extract counteracts oxidative stress and cytotoxicity of fumonisin in rats. **Toxicol**, v. 56, n. 1, p. 8-18, Aug 1 2010. ISSN 1879-3150 (Electronic) 0041-0101 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20230848> >.

HIROOKA, E. Y. et al. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. **Food Addit Contam**, v. 13, n. 2, p. 173-83, Feb-Mar 1996. ISSN 0265-203X (Print) 0265-203X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9064243> >.

HOWARD, P. C. et al. Comparison of the toxicity of several fumonisin derivatives in a 28-day feeding study with female B6C3F(1) mice. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 185, n. 3, p. 153-65, Dec 15 2002. ISSN 0041-008X (Print) 0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12498732> >.

HOWARD, P. C. et al. Fumonisin B-1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F(1) mice. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 277-282, May 2001. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <Go to ISI>://000168824500014 >.

HSIAO, S. H. et al. Use of formalin-fixed tissues to determine fumonisin B1-induced sphingolipid alterations in swine. **J Vet Diagn Invest**, v. 19, n. 4, p. 425-30, Jul 2007. ISSN 1040-6387 (Print) 1040-6387 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17609357> >.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. **Annu Rev Physiol**, v. 65, p. 817-49, 2003. ISSN 0066-4278 (Print) 0066-4278 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12524462> >.

KANG, H. C.; LEE, Y. M.; KIM, H. D. Mitochondrial disease and epilepsy. **Brain Dev**, v. 35, n. 8, p. 757-61, Sep 2013. ISSN 1872-7131 (Electronic) 0387-7604 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23414619> >.

KLEEN, J. K.; HOLMES, G. L. Brain inflammation initiates seizures. **Nat Med**, v. 14, n. 12, p. 1309-10, Dec 2008. Disponível em: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19057551 >.

KOVACS, R. et al. Mitochondrial calcium ion and membrane potential transients follow the pattern of epileptiform discharges in hippocampal slice cultures. **J Neurosci**, v. 25, n. 17, p. 4260-9, Apr 27 2005. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15858052> >.

KWON, O. S.; SCHMUED, L. C.; SLIKKER, W., JR. Fumonisin B1 in developing rats alters brain sphinganine levels and myelination. **Neurotoxicology**, v. 18, n. 2, p. 571-79, 1997. ISSN 0161-813X (Print) 0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9291505> >.

KWON, O. S.; SLIKKER, W., JR.; DAVIES, D. L. Biochemical and morphological effects of fumonisin B(1) on primary cultures of rat cerebrum. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 22, n. 4, p. 565-72, Jul-Aug 2000. ISSN 0892-0362 (Print) 0892-0362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974595> >.

LEDOUX, D. R. et al. Fumonisin toxicity in broiler chicks. **J Vet Diagn Invest**, v. 4, n. 3, p. 330-3, Jul 1992. ISSN 1040-6387. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1515495> >.

LINGREL, J. B. et al. Na,K-ATPase and the role of alpha isoforms in behavior. **J Bioenerg Biomembr**, v. 39, n. 5-6, p. 385-9, Dec 2007. ISSN 0145-479X (Print) 0145-479X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18044013> >.

LOSCHER, W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. **Eur J Pharmacol**, v. 610, n. 1-3, p. 1-11, May 21 2009. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19292981> >.

LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-68, Jun 2011. ISSN 1532-2688 (Electronic) 1059-1311 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292505> >.

LUPFERT, C. et al. Rate limitation of the Na(+),K(+)-ATPase pump cycle. **Biophys J**, v. 81, n. 4, p. 2069-81, Oct 2001. ISSN 0006-3495 (Print) 0006-3495 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566779> >.

MACEYKA, M. et al. Sphingosine kise, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1585, n. 2-3, p. 193-201, Dec 30 2002. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531554> >.

MACNAMARA, J. O. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Porto Alegre: Mc Graw Hill, 2010.

MARASAS, W. F. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environ Health Perspect**, v. 109 Suppl 2, p. 239-43, May 2001. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359691> >.

MARASAS, W. F. et al. Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. **J Nutr**, v. 134, n. 4, p. 711-6, Apr 2004. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15051815> >.

MARQUEZAN, B. P. et al. Pentylentetrazol-induced seizures are associated with Na(+),K(+)-ATPase activity decrease and alpha subunit phosphorylation state in the mice cerebral cortex. **Epilepsy Res**, v. 105, n. 3, p. 396-400, Aug 2013. ISSN 1872-6844 (Electronic) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23602551> >.

MEHTA, R. et al. Glutathione S-transferase-placental form expression and proliferation of hepatocytes in fumonisin B1-treated male and female Sprague-Dawley rats. **Cancer Lett**, v. 128, n. 1, p. 31-9, Jun 5 1998. ISSN 0304-3835 (Print) 0304-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9652790> >.

MERRILL, A. H., JR. et al. Importance of sphingolipids and inhibitors of sphingolipid metabolism as components of animal diets. **J Nutr**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 830S-833S, May 1997. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164247> >.

MERRILL, A. H., JR. et al. Fumonisins and other inhibitors of de novo sphingolipid biosynthesis. **Adv Lipid Res**, v. 26, p. 215-34, 1993. ISSN 0065-2849 (Print) 0065-2849 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8379451> >.

MERRILL, A. H. et al. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environ Health Perspect**, v. 109 Suppl 2, p. 283-9, May 2001. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359697> >.

MONNET-TSCHUDI, F. et al. The naturally occurring food mycotoxin fumonisin B1 impairs myelin formation in aggregating brain cell culture. **Neurotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 41-8, Feb 1999. ISSN 0161-813X (Print)
0161-813X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10091857> >.

MORRIS, D. D. Endotoxemia in horses. A review of cellular and humoral mediators involved in its pathogenesis. **J Vet Intern Med**, v. 5, n. 3, p. 167-81, May-Jun 1991. ISSN 0891-6640 (Print)
0891-6640 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1920254> >.

OSUCHOWSKI, M. F.; EDWARDS, G. L.; SHARMA, R. P. Fumonisin B-1-induced neurodegeneration in mice after intracerebroventricular infusion is concurrent with disruption of sphingolipid metabolism and activation of proinflammatory signaling. **Neurotoxicology**, v. 26, n. 2, p. 211-221, Mar 2005. ISSN 0161-813X. Disponível em: < <Go to ISI>://000227513500007 >.

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

POZZI, C. R. et al. Effects of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rats. **Mycopathologia**, v. 151, n. 1, p. 21-7, 2001. ISSN 0301-486X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502059> >.

RAMBO, L. M. et al. Acute creatine administration improves mitochondrial membrane potential and protects against pentylentetrazol-induced seizures. **Amino Acids**, v. 44, n. 3, p. 857-68, Mar 2013. ISSN 1438-2199 (Electronic)
0939-4451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23064877> >.

RANSOM, C. B.; RANSOM, B. R.; SONTHEIMER, H. Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na⁺ pumps. **J Physiol**, v. 522 Pt 3, p. 427-42, Feb 1 2000. ISSN 0022-3751 (Print)
0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713967> >.

REVERBERI, M. et al. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 87, n. 3, p. 899-911, Jul 2010. ISSN 1432-0614 (Electronic)
0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20495914> >.

RILEY, R. T. et al. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin-containing feeds in pigs. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 118, n. 1, p. 105-12, Jan 1993. ISSN 0041-008X (Print)
0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8430417> >.

RILEY, R. T. et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environ Health Perspect**, v. 109 Suppl 2, p. 301-8, May 2001. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11359699> >.

RILEY, R. T. et al. Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. **J Nutr**, v. 124, n. 4, p. 594-603, Apr 1994. ISSN 0022-3166 (Print)
0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8145083> >.

ROSS, P. F. et al. Fumonisin B1 concentrations in feeds from 45 confirmed equine leukoencephalomalacia cases. **J Vet Diagn Invest**, v. 3, n. 3, p. 238-41, Jul 1991. ISSN 1040-6387 (Print)
1040-6387 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1911996> >.

SABINO, M. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, 1996.

SEO, J. A.; LEE, Y. W. Natural occurrence of the C series of fumonisins in moldy corn. **Appl Environ Microbiol**, v. 65, n. 3, p. 1331-4, Mar 1999. ISSN 0099-2240 (Print)
0099-2240 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10049903> >.

SHEPHARD, G. S. et al. Determination of the mycotoxin fumonisin B1 and identification of its partially hydrolysed metabolites in the faeces of non-human primates. **Food and Chemical Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 23-9, Jan 1994. ISSN 0278-6915 (Print)
0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8132161> >.

SMITH, J. E. S., G.; LEWIS, C.; ANDERSON, J. G. . **Natural Toxins**. England: 1995.

STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. **Hum Exp Toxicol**, v. 27, n. 11, p. 799-809, Nov 2008. ISSN 0960-3271 (Print)
0960-3271 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19244287> >.

TAKAHASHI, N. et al. Locally synchronized synaptic inputs. **Science**, v. 335, n. 6066, p. 353-6, Jan 20 2012. ISSN 1095-9203 (Electronic)
0036-8075 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22267814> >.

THEUMER, M. G. et al. Subchronic mycotoxicoses in Wistar rats: assessment of the in vivo and in vitro genotoxicity induced by fumonisins and aflatoxin B(1), and oxidative stress biomarkers status. **Toxicology**, v. 268, n. 1-2, p. 104-10, Jan 31 2010. ISSN 1879-3185 (Electronic)

0300-483X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20015463> >.

TORRES, Á. E. C. **Temas de Higiene de Los Alimentos**. Ciudad de La Habana: 2008. 382.

TSUNODA, M.; SHARMA, R. P.; RILEY, R. T. Early fumonisin B1 toxicity in relation to disrupted sphingolipid metabolism in male BALB/c mice. **J Biochem Mol Toxicol**, v. 12, n. 5, p. 281-9, 1998. ISSN 1095-6670 (Print)
1095-6670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9664234> >.

VERARDI, G.; DE FROIDMONT-GORTZ, I. Overview on community legislation in the field of official control of mycotoxins in feedingstuffs. **Nat Toxins**, v. 3, n. 4, p. 248-56; discussion 280, 1995. ISSN 1056-9014 (Print)
1056-9014 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7582625> >.

VOSS, K. A. et al. In vivo effects of fumonisin B1-producing and fumonisin B1-nonproducing *Fusarium moniliforme* isolates are similar: fumonisins B2 and B3 cause hepato- and nephrotoxicity in rats. **Mycopathologia**, v. 141, n. 1, p. 45-58, 1998. ISSN 0301-486X (Print)
0301-486X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9725030> >.

VOSS, K. A.; SMITH, G. W.; HASCHEK, W. M. Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, n. 3-4, p. 299-325, Oct 1 2007. ISSN 0377-8401. Disponível em: < <Go to ISI>://000249473500007 >.

WANG, E. et al. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. **J Biol Chem**, v. 266, n. 22, p. 14486-90, Aug 5 1991. ISSN 0021-9258 (Print)
0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1860857> >.

WILD, C. P.; GONG, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 1, p. 71-82, Jan 2010. ISSN 1460-2180 (Electronic)
0143-3334 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19875698> >.

WILSON, T. M. et al. Fumonisin B1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. **J Vet Diagn Invest**, v. 2, n. 3, p. 213-6, Jul 1990. ISSN 1040-6387 (Print)
1040-6387 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2094447> >.

WU, F.; GROOPMAN, J. D.; PESTKA, J. J. Public health impacts of foodborne mycotoxins. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 5, p. 351-72, 2014. ISSN 1941-1413 (Print)
1941-1421 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24422587> >.

5. ANEXOS

Anexo A- Effect of exposition to FB1 (8 mg/kg i.p.) on seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg i.p.). Fig. 7A represents the latency for tonic-clonic seizure and Fig. 7B its duration. Data are median and interquartile, n=4 animals in each group.

