

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

Micheli Dassi

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS
INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO À FUMONISINA B₁ EM
CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Santa Maria, RS

2017

Micheli Dassi

**AVALIAÇÃO DE EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS INDUZIDOS
PELA EXPOSIÇÃO À FUMONISINA B₁ EM CAMUNDONGOS**

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

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

Santa Maria, RS, Brasil

2017

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

Dassi, Micheli

Avaliação de efeitos comportamentais e bioquímicos induzidos pela exposição à Fumonisina B1 em camundongos / Micheli Dassi.- 2017.

103 f.; 30 cm

Orientadora: Ana Flávia Furian

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2017

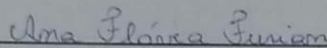
1. Micotoxinas 2. Fumonisina 3. Toxicidade 4. Animais I. Furian, Ana Flávia II. Título.

Micheli Dassi

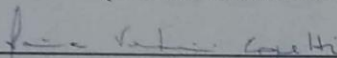
**AVALIAÇÃO DE EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS
INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO À FUMONISINA B₁ EM CAMUNDONGOS**

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

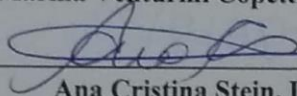
Aprovado em 14 de dezembro de 2017:



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



Marina Venturini Copetti, Dr.^a (UFSM)



Ana Cristina Stein, Dr.^a (URI)

Santa Maria, RS, 2017

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Dirceu e Elisabete por todo incentivo, compreensão e amor concedidos durante toda minha vida e a todos os amigos e familiares que próximos ou distantes, sempre foram estímulo e apoio em todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por possibilitar que nossos maiores sonhos sejam realizados sempre e no momento certo.

À minha orientadora Prof^a Dra. Ana Flávia Furian, pelo acolhimento, compreensão, ensinamentos, e especialmente por seu exemplo de profissionalismo, humildade e dedicação.

Ao Prof. Dr. Mauro Oliveira pelas contribuições extremamente importantes durante toda a execução do projeto.

Aos meus pais, Dirceu e Elisabete por desde a infância me estimularem na busca pelo conhecimento, por terem feito o possível e o impossível para que eu seguisse em frente e chegasse até aqui. Sempre vou lembrar de vocês repetindo que o conhecimento é única coisa que nunca poderá ser tirada de alguém. Obrigada por todo incentivo, amor, esforço, pelos abraços apertados nos momentos de desespero, por serem meu exemplo de honestidade e perseverança.

Às minhas companheiras de laboratório Naiéli, Ana Cláudia, Érica e Andressa pelas incontáveis vezes em que me auxiliaram, ensinaram e sobretudo compartilharam momentos que certamente ficarão guardados para sempre no coração. Saibam que são para mim um dos maiores presentes que recebi durante estes anos.

Aos meus colegas de mestrado Suslin, Rebeca, Rosane, Suelen, Victoria e, de forma especial, Marina e Gilson, por tornarem os dias difíceis mais simples com conversas, brincadeiras e carinho.

A todos os amigos que mesmo distantes estiveram presentes, compartilhando cada desafio e cada conquista durante toda minha vida. Obrigada por me ouvirem nas conversas intermináveis, pelo carinho em cada reencontro com aquela frase de sempre: “vai dar tudo certo praguinha”, pelos momentos de alegria e sonhos compartilhados. Levo comigo e sempre levarei um poquinho de cada um de vocês para onde eu for.

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

Ao CNPq e FAPERGS, pelo fornecimento das condições financeiras necessárias à realização deste projeto e em especial ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

Enfim, a todos aqueles que de uma forma ou outra participaram da concretização deste sonho, muito obrigada!!!

“Quando você quer alguma coisa, todo universo conspira para que você realize seu desejo!”

(Paulo Coelho)

RESUMO

AVALIAÇÃO DE EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS INDUZIDOS PELA EXPOSIÇÃO À FUMONISINA B₁ EM CAMUNDONGOS

AUTORA: MICHELI DASSI
ORIENTADORA: ANA FLÁVIA FURIAN

As fumonisinas são micotoxinas produzidas por diversas espécies de fungos pertencentes ao gênero *Fusarium*, em especial pelo *Fusarium verticillioides*. Dentre as diversas fumonisinas existentes, a fumonisina B₁ (FB₁) é a de maior incidência e também considerada a de maior toxicidade. Esta micotoxina ocorre como um contaminante natural em diversos produtos agrícolas, principalmente no milho e conseqüentemente, em produtos derivados do mesmo. A contaminação de seres humanos e animais por esta micotoxina pode ocorrer de modo direto, através da ingestão dos cereais contaminados, ou de modo indireto, pela ingestão dos produtos derivados contaminados. A FB₁ é relacionada com a ocorrência de diversos danos à saúde humana e animal, tais como alterações neurológicas, imunológicas, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, dentre outros. O mecanismo da toxicidade da FB₁ ainda não é completamente elucidado, mas acredita-se que o mecanismo principal consiste na alteração do metabolismo dos esfingolipídios. Além disso, vem-se pesquisando a relação da FB₁ com desequilíbrio no sistema oxidativo do organismo como um possível mecanismo de toxicidade da mesma. Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar os efeitos tóxicos causados pela administração intraperitoneal de FB₁ (8 mg/kg) por quatro dias, sobre parâmetros comportamentais e de estresse oxidativo em camundongos machos jovens. Após as quatro doses, os animais foram submetidos aos testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento de objetos, Marble Buryng, construção de ninho) e em seguida foram realizadas as análises bioquímicas. O único efeito comportamental observado foi o aumento do escore no teste do ninho após o tratamento com a FB₁. No fígado, rins e pulmão, os marcadores não enzimáticos de estresse oxidativo analisados foram: espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de tióis não-proteicos (NPSH), conteúdo de ácido ascórbico, determinação do poder antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) e determinação do óxido nítrico indireto (NOx). Nas amostras de córtex cerebral e hipocampo foram determinados o conteúdo de tióis não-proteicos (NPSH) e o poder antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) e alterações na imunoreatividade da proteína quinase C (PKC-Ser957) no hipocampo. Os resultados mostram que a FB₁ promove alterações em parâmetros de estresse oxidativo de modo diferente de acordo com o órgão, como observado pelo aumento de NPSH em fígado e pulmão e diminuição do FRAP em fígado e rim. A nível cerebral, nenhuma alteração foi observada em marcadores de estresse oxidativo em córtex e hipocampo, bem como não houve alteração na imunoreatividade da proteína quinase C em hipocampo. Pode-se concluir que a administração de FB₁ alterou parâmetros oxidativos em fígado, rim e pulmão e predispôs mudanças nos parâmetros relacionados à ansiedade dos animais.

Palavras-chave: micotoxinas, comportamento, estresse oxidativo, neurotoxicidade.

ABSTRACT

EVALUATION OF BEHAVIORAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS INDUCED BY EXPOSURE TO FUMONISIN B₁ IN MICE

AUTHOR: MICHELI DASSI
ADVISER: ANA FLÁVIA FURIAN

Fumonisin is a mycotoxin produced by several species of fungi belonging to the genus *Fusarium*, especially by *Fusarium verticillioides*. Among the various fumonisins, fumonisin B₁ (FB₁) is the one with the highest incidence and also considered to be the most toxic. This mycotoxin occurs as a natural contaminant in several agricultural products, mainly in corn, and consequently in products derived from it. Contamination of humans and animals by this mycotoxin can occur directly, through the ingestion of contaminated cereals, or indirectly, by the ingestion of contaminated products. FB₁ is related with the occurrence of various damages to human and animal health, such as neurological, immunological, nephrotoxicity and hepatotoxicity, among others. Mechanism by FB₁ toxicity is not completely elucidated, but the main mechanism is believed to be the alteration of the metabolism of the sphingolipids. In addition, we have been investigating the relation of FB₁ with imbalance in the oxidative system of the organism as a possible mechanism of its toxicity. Thus, the objective of this study is to evaluate the toxic effects caused by the intraperitoneal administration of FB₁ (8mg/kg b.w.) for four days, on behavioral parameters and oxidative stress in young male mice. After the four doses, the animals were submitted to behavioral tests (open field, object recognition, Marble Burying, nest building) and then the biochemical analyzes were performed. The only behavioral effect observed was the increase in the nest test score after treatment with FB₁. In liver, kidney and lung, the non-enzymatic oxidative stress markers analyzed were: thiobarbituric acid reactive species (TBARS), non-protein thiol content (NPSH), ascorbic acid content, antioxidant power by the iron reduction method (FRAP) and determination of indirect nitric oxide (NOx). In the cerebral cortex and hippocampus samples, the content of non-protein thiols (NPSH) and the antioxidant power by the iron reduction method (FRAP) and changes in the immunoreactivity of protein kinase C (PKC-Ser957) in the hippocampus. The results show that FB₁ promotes changes in oxidative stress parameters differently from those of the organ, as observed by the increase of NPSH in liver and lung and decrease of FRAP in liver and kidney. At the brain level, no change was observed in markers of oxidative stress in the cortex and hippocampus, as well as no change in the immunoreactivity of protein kinase C in the hippocampus. It can be concluded that the administration of FB₁ altered oxidative parameters in liver, kidney and lung and predisposed changes in the parameters related to the anxiety of the animals.

Key words: mycotoxins, behavior, oxidative stress, neurotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estrutura química da Fumonisin B ₁	22
Figura 2 – Estrutura química da esfinganina, esfingosina e fumonisin B ₁	23
Figura 3 – Locais de ação das fumonisin no metabolismo dos esfingolipídios.....	23
Figura 4 – Redução sequencial do oxigênio à água.....	28

RESULTADOS – ARTIGO 1

Figure 1 – Effect of fumonisin B ₁ (8 mg/kg/i.p.) on non protein thiols (NPSH) in liver (A), kidney (B) and lung (C) of male mice. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....	60/61
---	-------

Figure 2 – Effect of fumonisin B ₁ (8 mg/kg/i.p.) on antioxidant power of iron reduction (FRAP) in liver (A), kidney (B) and lung (C) of male mice. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....	61 e 62
--	------------

RESULTADOS – ARTIGO 2

Figure 1 – Effect of Fumonisin B ₁ (8 mg/kg i.p.) 4 days after exposition on the levels of p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio in hippocampus of male mice C57BL/6. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 6 animals in each group.....	84
---	----

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Limites Máximos Tolerados (LMT) para fumonisinas (FB₁ + FB₂) em milho e produtos derivados.....20

RESULTADOS – ARTIGO 1

Table 1 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on the organ weight of animals. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....62

Table 2 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on organ-to-body weight ratio, organ-to-adrenal gland weight ratio and organ-to-brain weight ratio. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....63

Table 3 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on TBARS content in liver, kidney and lung of male mice. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....64

Table 4 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on ascorbic acid content in liver, kidney and lung of male mice. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....64

Table 5 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on NO_x content in liver, kidney and lung of male mice. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....65

RESULTADOS – ARTIGO 2

Table 1 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on open field test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....85

Table 2 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on object recognition test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....85

Table 3 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on nest test and marble buryng test. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group. * Indicates a significant difference compared to vehicle group.....86

Table 4 – Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on NPSH and FRAP in cerebral córtex and hippocampus. Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.....86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HIAA	Ácido 5-hidroxiindolacético
5HIAA/5HT	Razão ácido 5-hidroxiindolacético/serotonina
5HT	Serotonina
AA	Ácido Ascórbico
AFB ₁	Aflatoxina B ₁
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
DA	Dopamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzóico)
EREs	Espécies reativas de enxofre
ERK	Proteína quinase ativada por mitógeno
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FB ₁	Fumonisina B ₁
FB ₂	Fumonisina B ₂
FB ₃	Fumonisina B ₃
Fe ²⁺ -TPTZ	Ferroso-tripiridiltriazina
Fe ³⁺ -TPTZ	Ferritripiridiltriazina
FRAP	Poder antioxidante pela redução do ferro
GSH	Glutationa
GPx	Glutationa peroxidase
HOCl	Ácido Hipocloroso
HOH [·]	Íon peroxil
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agência Interacional para Pesquisa sobre o Câncer)
IDMT	Ingestão diária máxima tolerável

IgG	Imunoglobulina G
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
kg	Quilograma
JECFA	Joint Expert Committee on Food Additives (Comitê Conjunto FAO/ /OMS de Peritos em Aditivos Alimentares)
K ⁺	Potássio
LEME	Leucoencefalomalácia equina
Mg	Miligrama
Na ²⁺	Sódio
NE	Norepinefrina
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
NO ⁻	Óxido nítrico
NO _x	Óxido nítrico indireto
NPSH	Tióis não-proteicos
OSI	Índice de estresse oxidativo
p.c.	Peso corporal
PKC	Proteína quinase C
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
TAC	Capacidade antioxidante total
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TNB	Ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico
TOS	Estado antioxidante total
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIGRÁFICA	19
2.1. MICOTOXINAS	19
2.2 FUMONISINAS	21
2.2.1 Efeitos Biológicos das Fumonisin	27
2.3 NEUROTOXICIDADE RELACIONADA ÀS FUMONISINAS	28
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO	29
2.4.1 Estresse Oxidativo e Fumonisin	34
2.5 APRENDIZADO E MEMÓRIA	36
2.6 ANSIEDADE, MEDO E COMPORTAMENTO DEPRESSIVO	37
3. OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVO GERAL	40
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4. ARTIGO 1 - <i>Effects of repeated Fumonisin B₁ exposure on markers of oxidative stress in liver, kidneys and lungs of C57BL/6 mice</i>	41
5. ARTIGO 2 - <i>Effects of exposure to Fumonisin B₁ on behavioral and biochemical parameters in brain of C57BL/6 mice</i>	68
6. DISCUSSÃO	89
7. CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94
ANEXOS	104

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos amplamente distribuídos na natureza e que produzem grande quantidade de substâncias com estruturas químicas e atividades biológicas variadas. Alguns dos metabólitos produzidos por fungos são extremamente benéficos, sendo desejados como componentes de alguns alimentos e outros empregados como antibióticos importantes. No entanto, alguns fungos podem produzir substâncias tóxicas altamente prejudiciais à saúde humana e animal, sendo estas conhecidas como micotoxinas (SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014).

A colonização e a contaminação dos alimentos pelas micotoxinas podem ocorrer de forma simultânea, ou a produção pode ocorrer em uma fase posterior, uma vez que, os fungos produtores de micotoxinas podem colonizar os alimentos durante os períodos de pré-colheita, colheita ou de armazenamento (LOGRIECO et al., 2003).

Dentre as micotoxinas de maior importância tanto do ponto de vista da saúde pública quanto da agro-economia, destacam-se as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zeralenona e as fumonisinas (ZAIN, 2011).

Em um levantamento mundial sobre a presença de micotoxinas realizado de janeiro a junho de 2017, amostras de alimentos e de matérias-primas que abrangem componentes comuns da alimentação, tais como milho, cevada, farinhas, grãos secos, entre outros, provenientes de 63 países, foram analisados quanto à presença de micotoxinas, sendo que um total de 94% de todas as amostras continham pelo menos uma micotoxina e 76% de todas as amostras continham duas ou mais micotoxinas. Além disso, os dados indicam que desoxinivalenol e fumonisinas são as micotoxinas mais comumente encontradas (BIOMIN, 2017).

As fumonisinas são micotoxinas produzidas durante o metabolismo secundário de fungos do gênero *Fusarium* destacando-se o *Fusarium verticillioides* (MARASAS, 2001). São identificados um conjunto de cerca de 16 compostos tóxicos de fumonisinas sendo que a mais comum, correspondendo a cerca de 70 a 80% do teor total de fumonisinas do *Fusarium verticillioides* e considerada a de maior toxicidade, é a fumonisina B₁ (FB₁) (POZZI et al., 2002).

A FB₁ é considerada uma das principais micotoxinas presentes no milho (*Zea mays* L.), bem como, em produtos derivados e uma vez que estes produtos são altamente

empregados tanto na alimentação humana quanto animal, sendo a dieta considerada a principal forma de contaminação (MARASAS, 2001).

O consumo animal de alimentos contaminados por FB₁, mostra-se relacionado com o desenvolvimento de danos graves, tais como leucoencefalomalácia em equinos, edema pulmonar em suínos (WASKIEWICZ, BEZSTERDA & GOLINSKI, 2012), além de diversos relatos de envolvimento no desenvolvimento de danos hepatotóxicos e nefrotóxicos em diversas espécies animais (VOSS et al., 2002; POZZI et al., 2002; ENOGENE et al. 2000).

Em seres humanos, o consumo de alimentos contaminados pela FB₁ é relacionado ao desenvolvimento de câncer esofágico, danos hepáticos, renais, defeitos neuronais e cardiovasculares (WASKIEWICZ, BEZSTERDA & GOLINSKI, 2012). Devido a evidências toxicológicas a FB₁ foi classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), como possível cancerígeno para humanos (Grupo 2B) (IARC, 2002).

O mecanismo pelo qual a FB₁ causa danos não é completamente elucidado, mas a justificativa mais aceita e apoiada por evidências experimentais é a de que a FB₁ interfira no metabolismo dos esfingolipídios de membrana, afetando processos de crescimento e diferenciação celular nos quais estes estão diretamente envolvidos (SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014). Além disso, diversos estudos relacionam a intoxicação pela FB₁ com alterações em marcadores de estresse oxidativo (POERSCH et al., 2014; MARY et al., 2012) e alterações nos níveis de aminas biogênicas (TSUNODA et al., 1998; PORTER et al., 1993), o que poderia relacionar a intoxicação por FB₁ com o desenvolvimento de alterações em processos cognitivos, desenvolvimento de quadros depressivos e de ansiedade.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos comportamentais e bioquímicos resultantes da exposição de camundongos à FB₁, de modo a elucidar o mecanismo pelo qual estes danos ocorrem e desta forma buscar alternativas para redução ou prevenção dos mesmos, trazendo benefícios à saúde humana e animal.

2. REVISÃO BIBLIGRÁFICA

2.1. MICOTOXINAS

O termo micotoxina é derivado da palavra grega “*mykes*” que significa fungo e “*toxican*” do latim toxinas, sendo usado para designar um grupo de compostos tóxicos produzidos por algumas espécies fúngicas durante seu metabolismo secundário (IAMANAKA; OLIVEIRA & TANIWAKI, 2010), que apresentam como principais características um amplo espectro de toxicidade, baixo peso molecular, não-imunogenicidade, termo-estabilidade e atuação em baixas concentrações (BOK; KELLER & LAE, 2004).

Há muitos anos é conhecido que a ingestão de alguns macrofungos (cogumelos) pode representar riscos à saúde, no entanto mais recentemente, se confirmou também que metabólitos produzidos por fungos filamentosos (microfungos) têm sido responsáveis por verdadeiras epidemias em humanos e animais (FREIRE et al., 2007).

No ano de 1960, na Inglaterra, mais de 100 mil perus morreram devido a uma intoxicação acompanhada por quadros de hemorragias internas e necrose hepática. Estudos constataram que esta intoxicação havia sido causada pela ingestão de farinha de amendoim contaminada por um metabólito tóxico produzido por uma espécie de fungo filamentoso pertencente ao gênero *Aspergillus*. Após este fato, a influência das micotoxinas para a saúde humana e animal despertou atenção da comunidade científica e as mesmas vem sendo objeto constante de estudo (SOARES et al., 2013).

Atualmente diversas micotoxinas já foram isoladas, contudo, as mais conhecidas encontradas em alimentos e que comprovadamente tem propriedades tóxicas acentuadas são as toxinas do Ergot, aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, patulina e fumonisina (SCUSSEL, 1998).

Para que ocorra a produção de micotoxinas são necessárias condições favoráveis ao desenvolvimento fúngico, tais como umidade, temperatura, pH, composição química do alimento e potencial de redox (PEREIRA & SANTOS, 2011). Além disso, é importante levar em consideração que diferentes espécies de fungos são capazes de produzir um mesmo tipo de micotoxina, bem como uma única espécie pode ser capaz de produzir várias micotoxinas diferentes (HUSSEIN & BRASSEL, 2001). No entanto, nem todos os fungos são produtores de micotoxinas, desta forma, a presença do fungo não implica necessariamente na presença de micotoxinas (DINIZ, 2002).

Por serem contaminantes naturais, o controle do desenvolvimento destas substâncias nos alimentos é extremamente difícil. Além disso, pelo fato da produção destas toxinas estar diretamente ligada ao crescimento fúngico, pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita ou estocagem do alimento (IAMANAKA; OLIVEIRA & TANIWAKI, 2010).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana diretamente através da ingestão de cereais, sementes, especiarias, frutas, bebidas e outros produtos vegetais, e indiretamente por produtos alimentícios obtidos a partir de animais que ingeriram dietas contaminadas resultando na permanência de resíduos em leite, carne, ovos e outros derivados (DIAZ, 2005).

Consumidores de países desenvolvidos são certamente menos expostos às micotoxinas que aqueles de países em desenvolvimento, isto devido a fatores como abundância de fontes alimentícias, tecnologia moderna de manipulação e conservação, regulação e controle da qualidade dos alimentos. No entanto, commodities importadas de países em desenvolvimento podem representar um risco global de exposição caso rigorosas políticas de controle não sejam aplicadas (DIAZ, 2005).

Apesar de não ser possível eliminar completamente a presença das micotoxinas nos alimentos, seu nível pode e deve ser reduzido e tendo em vista o controle da presença destas em alimentos, a maioria dos países estabeleceu limites máximos para a presença de micotoxinas nos alimentos (SOARES, ABRUNHOSA & VENÂNCIO, 2013).

No Brasil, no ano de 2011 foi estabelecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a RDC nº 7 (RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011) que dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) de micotoxinas em alimentos. Através deste regulamento ficaram estabelecidos os limites máximos aceitáveis de micotoxinas em alimentos prontos para oferta ao consumidor e em matérias-primas (BRASIL, 2011).

A exposição às micotoxinas ocorre principalmente através da ingestão de alimentos contaminados, mas também pode ocorrer por inalação ou por via cutânea (BENNET & KLICH, 2003). A toxicidade de uma micotoxina após exposição é determinada por uma sequência de eventos (metabolismo), que compreende a administração, a absorção, transformação, farmacocinética, interações moleculares, distribuição e excreção da toxina e seus metabólitos. Por sua vez, a toxicidade de uma micotoxina vai manifestar seus efeitos na saúde e produtividade das culturas, pessoas e animais, e esses efeitos poderão influenciar o valor econômico das atividades humanas, produtos agrícolas e pecuários (FAO, 2004).

A severidade dos efeitos tóxicos produzidos pela exposição às micotoxinas está relacionada com alguns fatores, tais como a quantidade ingerida, tempo de exposição, possíveis sinergias toxicológicas causadas pela ingestão simultânea de diferentes micotoxinas. Além disso, fatores relacionados aos indivíduos expostos, como a idade, sexo e estado fisiológico também podem influenciar na extensão dos efeitos tóxicos (SOARES, ABRUNHOSA & VENÂNCIO, 2013).

A doença ou síndrome causada pela ingestão de alimentos contaminados com micotoxinas é denominada micotoxicose e pode causar danos ao crescimento, afetar funções do organismo favorecendo o desenvolvimento de tumores e até mesmo provoca a morte de seres humanos e animais (SCUSSEL, 1998).

As micotoxicoses podem atingir seres humanos ou animais de forma aguda ou crônica. As manifestações agudas ocorrem quando são consumidas doses moderadas a altas de micotoxinas e os sinais clínicos podem aparecer associados a um estado patológico específico. Apesar das lesões variarem de acordo com o tipo de micotoxina, as mais comuns são hepatite, hemorragia, nefrite, necrose da membrana da mucosa digestiva e morte. Já as micotoxicoses crônicas, ocorrem quando são consumidas concentrações mais baixas de micotoxinas e nestes casos, os sintomas geralmente estão relacionados a diminuição na taxa de crescimento e ganho de peso, alterações reprodutivas e taxa de conversão alimentar em animais (MALLMANN et al., 2009).

As micotoxicoses agudas geralmente atingem os animais, uma vez que os mesmos são geralmente expostos a uma alta dose de micotoxinas em um curto espaço de tempo, resultando em manifestações e intensidade específicas. Já nos seres humanos a contaminação crônica é a mais preocupante, uma vez que se torna mais difícil relacionar a ingestão da micotoxina com as doenças causadas, pois geralmente a exposição ocorre através da ingestão de quantidades pequenas da mesma por um período mais longo (FERNANDEZ-TAVEJO, 2008).

2.2 FUMONISINAS

As fumonisinas consistem em uma família de micotoxinas de origem alimentar que foram descritas e caracterizadas pela primeira vez em 1988 a partir de culturas de *Fusarium verticillioides* (anteriormente *Fusarium moniliforme*) (MARASAS, 2001). É conhecido um conjunto de cerca de 16 compostos tóxicos de fumonisinas, sendo que destas, a de maior

ocorrência (cerca de 70% do total de fumonisinas produzidas por *Fusarium verticillioides*) e considerada a de maior toxicidade é a fumonisina B₁ (FB₁), seguida pela FB₂ e FB₃ (SOARES, ABRUNHOSA & VENÂNCIO, 2013; IAMANAKA, OLIVEIRA & TANIWAKI, 2010).

O grupo de fungos produtores das fumonisinas é um dos mais prevalentes associados à contaminação do milho e eventualmente em trigo, centeio, painço, sorgo, chá e arroz. O crescimento destes fungos ocorre em diversas temperaturas (entre 4 e 37 °C) e em atividades de água elevadas (superiores a 0.9) (MAGAN & OLSEN, 2004) sendo, desta forma, encontrados em todo o mundo, em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (DIAZ, 2005).

O processo de infecção das sementes e grãos de milho pelos fungos se inicia no campo, especialmente durante a fase de maturação fisiológica, e prossegue nas etapas seguintes de colheita, secagem, armazenamento transporte e processamento (LAZZARI, 1997).

Nos produtos derivados do milho um dos principais fatores que determina a concentração de fumonisina encontrada é a forma como a moagem dos grãos é processada, a seco ou úmido. A moagem a seco resulta na produção de frações como farelo, flocos e farinhas e uma vez que as fumonsinas se concentram no germe e na casca do grão inteiro, a moagem a seco resulta em frações com diferentes concentrações da mesma (IARC, 2002). Já na moagem úmida ocorre uma migração das fumonisinas para a solução aquosa, resultando em redução da concentração das mesmas (EMAN, 2000).

Ainda não existe uma legislação global que regule os níveis permitidos de fumonisinas no milho e em produtos derivados, mas grande parte dos países já apresentam regulamentação própria ou estabelecem níveis máximos para estas (LINO, SILVA & PENA, 2004). Na Tabela 1 são mostrados os limites máximos tolerados estabelecidos pela legislação brasileira (RDC nº 7, de 18 de fevereiro de 2011) para fumonisinas (FB₁ + FB₂) em milho e produtos derivados.

Tabela 1 – Limites Máximos Tolerados (LMT) para fumonisinas (FB₁ + FB₂) em milho e produtos derivados.

Alimento	LMT (µg/kg)
Milho para posterior processamento	5000
Milho de pipoca	2000

Alimentos à base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância).	200
Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	1500
Amido de milho e outros produtos à base de milho	1000

Fonte: (BRASIL, 2011)

A incidência de fumonsinas em milho e produtos derivados comercializados no Brasil tem sido relatada em diversos estudos. Kawashima & Valente Soares (2006), analisaram 74 amostras de produtos à base de milho adquiridas no comércio local da cidade de Recife (PE) e destas 71 apresentaram contaminação por FB₁ em concentrações variando de 20 a 8600 µg/kg. Já Martins et al. (2012), analisaram 100 amostras de produtos à base de milho comercializados no estado do Paraná, destas 82% apresentaram contaminação por FB₁ e 51% por FB₂, sendo que a maior proporção de contaminação foi observada na farinha (96,6%).

Ainda, estudos realizados por Rocha et al. (2009), avaliaram amostras de milho recém-colhido obtido a partir de quatro estados brasileiros: Mato Grosso (Várzea Grande), Rio Grande do Sul (Santa Maria), Bahia (Campinhos) e São Paulo (Nova Odessa), e constataram que 98% das amostras apresentavam contaminação por fumonsinas, sendo que para FB₁ os níveis de contaminação variaram entre 0,015 mg/kg a 9,67 mg/kg e para FB₂ de 0,015 mg/kg a 3,16 mg/kg.

Uma vez que o milho e seus derivados consistem em alguns dos principais produtos destinados ao consumo humano e animal em todo o mundo, pode-se considerar a alimentação uma das principais fontes de contaminação por estas micotoxinas (MARASAS, 2001).

A avaliação da ingestão de fumonsinas vem sendo investigada em diversas regiões do mundo e deve ser realizada com dados recentes de consumo de vários alimentos diferentes (BOEDIN, 2015). Com base em dados obtidos através de estimativas de consumo de alimentos possivelmente contaminados e estudos experimentais, o *Joint Expert Committee on Food and Additives* (JECFA), estabeleceu que a ingestão diária máxima tolerável (IDMT) para humanos de fumonisinas (FB₁, FB₂, FB₃) isoladas ou em combinação é de 2 µg/kg peso corporal/ dia com base em um NOAEL (Níveis de Efeitos Adversos Não Observados) de 0,2

mg/kg peso corpóreo/dia considerando a toxicidade em rins e aplicação de um fator de segurança de 100 (JECFA, 2011).

Quimicamente, as fumonisinas são compostos polares e solúveis em água e soluções aquosas de metanol e acetonitrila, mas insolúveis em solventes apolares (WASKIEWICZ, BEZSTERDA & GOLINSKI, 2012). A FB₁, considerada a de maior toxicidade, consiste em um diéster de propano 1,2,3-ácido tricarboxílico e 2-amino-12, 16 dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxieicosano, sendo que a porção amino terminal da molécula mostra-se necessária para sua função biológica (Figura 1) (STOCKMANN-JUVALA & SAVOLAINEN, 2008).

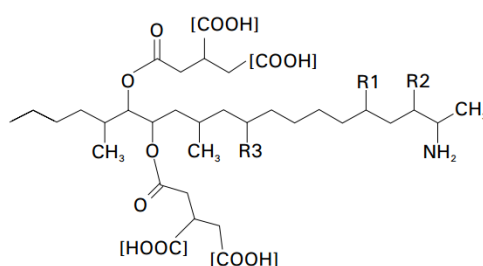


Figura 1 – Estrutura química da fumonisina B₁: R₁ = OH; R₂ = OH; R₃ = OH

Fonte: Freire, et al.; 2007.

O mecanismo de ação das fumonisinas não foi completamente elucidado, mas a causa mais provável relacionada aos mecanismos bioquímicos e moleculares que levam à toxicidade e a outros efeitos das fumonisinas é o bloqueio do metabolismo dos esfingolipídios, como consequência da inibição da enzima ceramida sintase que é a enzima central responsável pela conversão da base esfingóide em esfingolipídios (VOSS et al., 2001; SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que as fumonisinas, por serem estruturalmente análogas de bases esfingóides (Figura 2), agem como inibidores competitivos da esfinganina N-acetiltransferase e da esfingosina N-acetiltransferase (ceramida sintase). Uma vez que estas enzimas são consideradas elementos chave para a via metabólica da biossíntese dos esfingolipídios *de novo* e *turnover*, as fumonisinas podem alterar a concentração e proporção entre a esfinganina e a esfingosina, diminuindo a biossíntese da esfingosina e causando acúmulo do precursor esfinganina até níveis tóxicos e reduzindo a transformação de esfingosina a ceramida (LINO, SILVA & PENA, 2004; MILLER & TRENHOLM, 1997).

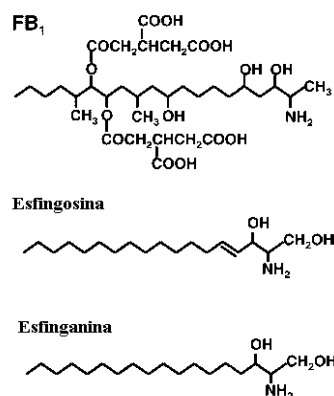


Figura 2- Estrutura química da esfinganina, esfingosina e FB₁.

Fonte: Minami et. al, 2004

A via de biossíntese *de novo* esfingolipídios inicia com a condensação da serina com palmitoil-CoA e prossegue rapidamente para a biossíntese de ceramida e mais lipídios complexos, sendo que a hidrólise destes resulta na produção de ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato que vão atuar na sinalização lipídica de moléculas. Em ambas etapas se faz necessária a ação da enzima ceramida sintase, que é bloqueada pela ação das fumonisinas (Figura 3) (VOSS et al., 2001).

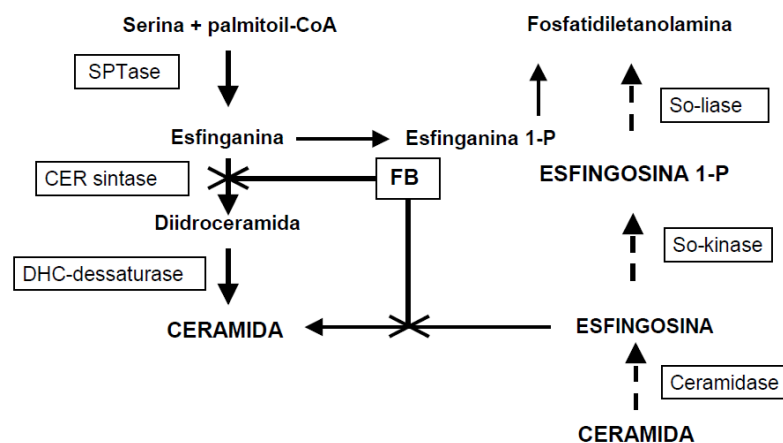


Figura 3 – Locais de ação das fumonisinas no metabolismo dos esfingolipídios. Abreviaturas: SPTase (serina palmitoiltransferase, CER sintase (ceramida sintase), DHC-dessaturase (diidroceramida dessaturase), So-kinase e -liase (esfingosina quinase e liase).

Fonte: Minami et al., 2004

Os esfingolipídios estão presentes nas membranas celulares estando envolvidos na comunicação celular, crescimento celular, diferenciação e transformação, bem como controle de proteínas de membrana (em especial inibição da proteína quinase C) (TURNER,

NIKIEMA & WILD, 1999; MILLER & TRENHOLM, 1997). A influência das fumonisinas em algumas destas fases pode desempenhar papel em sua carcinogenicidade aparente e em outros efeitos toxicológicos (MILLER & TRENHOLM, 1997).

O bloqueio da biossíntese dos esfingolipídios e o acúmulo de esfinganina também se relacionam com a ativação da proteína quinase ativada pelo estresse, estresse oxidativo, peroxidação lipídica e necrose tecidual (SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014; STOCKMANN-JUVALA & SAVOLAINEN, 2008).

Diversos estudos realizados com animais de fazenda e laboratório empregando dietas contaminadas com FB₁ tem demonstrado a existência de uma relação dose-dependente entre a exposição à fumonsina e os níveis teciduais e sanguíneos dos esfingolipídios-chave conhecidos por regular processos fisiológicos e vias de sinalização essenciais para a saúde destes animais (MARASAS et al., 2004 apud IARC, 2015).

Quanto à farmacocinética, na maioria dos animais, a absorção, distribuição e eliminação da FB₁ ocorre de forma rápida. As fumonisinas são pouco absorvidas e, embora existam evidências de que podem ser parcialmente metabolizadas no intestino, não há atualmente resultados convincentes. No entanto, estudos tem demonstrado que as fumonisinas podem alterar a atividade do citocromo P450 como resultado da inibição da enzima ceramida sintase (DIAZ, 2005).

Em estudos realizados com diferentes espécies animais após administração oral de fumonisina, as concentrações detectadas em plasma e tecidos foi de menos de 4% da dose e, embora seja distribuída para todos os tecidos, as maiores concentrações, em todos os animais estudados, foram detectadas em fígado e rim (BULDER et al., 2012). Além disso, tem sido demonstrado que as taxas de eliminação da FB₁ variam de acordo com o peso corporal. Em camundongos, a eliminação ocorre de forma muito rápida, enquanto que em seres humanos pode levar muito mais tempo (IARC, 2002).

Após a administração por via intraperitoneal ou intravenosa foi observado um acúmulo significativo de fumosina no fígado e rim de ratos, sendo que após a administração de uma única dose de FB₁ por via intraperitoneal (7,5 mg/kg) a concentração plasmática máxima é atingida dentro de 20 minutos e a eliminação sérica ocorre em aproximadamente 18 minutos (VOSS et al., 2001).

Diversos estudos utilizando diferentes vias de exposição e diferentes espécies animais têm demonstrado que as fumonisinas são excretadas principalmente nas fezes seja na forma inalterada ou com a perda de uma ou ambas cadeias laterais de ácidos tricarbálicos. Além

das fezes, menores concentrações foram detectadas na urina dos animais expostos à fumonisina (BULDER et al., 2012).

2.2.1 Efeitos Biológicos das Fumonisinas

A contaminação de alimentos e derivados pelas fumonisinas tem sido associada a diversas doenças, tanto em animais quanto em seres humanos, sendo que as manifestações clínicas e órgãos atingidos por estas toxicoses variam de acordo com as espécies (LINO, SILVA & PENA, 2004).

Um dos primeiros casos de toxicidade das fumonisinas em animais é o desenvolvimento da leucoencefalomalacia equina (LEME), uma síndrome neurológica que afeta principalmente os cavalos e é associada ao consumo de milho mofado. A LEME tem como alvo principal o sistema nervoso central e se caracteriza pelo amolecimento do encéfalo com acúmulo de células brancas do sangue. Os principais sintomas incluem superexcitação neurológica, cegueira, descoordenação motora e paralisia facial, surgindo rapidamente após a ingestão do alimento contaminado e podendo levar à morte dentro de 24 horas (SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014).

O envolvimento dos esfingolipídios como componentes das membranas celulares, especialmente no cérebro e no tecido nervoso, pode explicar os efeitos das fumonisinas na LEME (MILLER & TRENHOLM, 1997).

Outra espécie animal fortemente afetada pelos efeitos da ingestão de alimentos contaminados por FB₁ são os suínos, sendo relatados efeitos cardiotoxícos e edema pulmonar. Nos animais que desenvolvem edema pulmonar é observada a diminuição do consumo de ração, dispnéia, fraqueza, cianose e morte (MORGAVI & RILEY, 2007).

São relatados também, em diversos estudos, efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos relacionados a ingestão de FB₁ em várias espécies animais (VOSS et al., 2002; POZZI et al., 2000; ENOGENE et al., 2000). Os bovinos e aves são considerados menos sensíveis às fumonisinas do que cavalos, porcos, coelhos ou roedores de laboratório (MARIN et al., 2013).

Em humanos, apesar de não haver evidências diretas dos efeitos das fumonisinas para a saúde (MARIN et al., 2013), diversos estudos relatam relação entre as fumonisinas e danos ao fígado, rins, defeitos neuronais e cardiovasculares (WASKIEWICZ, BEZSTERDA & GOLINSKI, 2012).

Estudos realizados recentemente na Tanzânia sugerem que a exposição à FB₁ pode estar relacionada ao desenvolvimento de raquitismo em crianças (IARC, 2015). Além disso, a exposição de mulheres grávidas pode contribuir para aumentar o risco de defeitos no tubo neural dos bebês (BULDER et al., 2012) sendo que em estudos realizados por Missmer et al. (2006) observou-se que os riscos de surgimento de defeitos no tubo neural associado a exposição à fumonisina aumenta proporcionalmente à dose, até um nível limiar em que a morte é o mais provável de ocorrer.

A FB₁ também está relacionada com processos de imunossupressão em animais. A administração de FB₁ (2,25mg/kg, s.c.) em camundongos BALB/c machos e fêmeas, provocou um aumento na população de linfócitos T no baço, redução do peso relativo do baço e timo e decréscimo dos níveis plasmáticos de imunoglobulina G (IgG) apenas nas fêmeas em relação aos animais controle, sugerindo um efeito dependente do sexo, sendo as fêmeas mais susceptíveis (JOHNSON & SHARMA, 2001).

Com base em evidências toxicológicas, as fumonisinas foram classificadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), como possível cancerígeno para humanos (Grupo 2B) (IARC, 2002). Além disso, diversos estudos têm correlacionado o consumo de produtos com altos níveis de contaminação por FB₁ com a incidência de câncer esofágico em humanos em diversas regiões do mundo (DIAZ, 2005).

2.3 NEUROTOXICIDADE RELACIONADA ÀS FUMONISINAS

Embora a FB₁ tenha uma ampla gama de efeitos biológicos, o cérebro é, sem dúvida um órgão-alvo da sua toxicidade. Apesar de inúmeros estudos sobre a toxicidade da FB₁ terem sido realizados, poucos avaliaram seu potencial neurodegenerativo e o mecanismo subjacente a neurotoxicidade da mesma (DOMIJAN, 2012).

Um dos principais casos conhecidos de neurotoxicidade relacionado às fumonisinas é a LEME, síndrome que afeta principalmente cavalos e associada a ingestão de milho ou rações contaminadas. Esta síndrome causa necrose cerebral com amolecimento do encéfalo e acúmulo de células brancas do sangue (SHIBAMOTO & BJELDANES, 2014).

O curso clínico da LEME está diretamente relacionado com a quantidade da micotoxina ingerida e a tolerância individual. Os principais sinais clínicos são fraqueza generalizada, hiperexcitabilidade, desorientação, ataxia, andar em círculos, convulsões, coma

e morte. Estes sinais geralmente surgem de forma aguda, sendo observados em algumas horas ou até vários dias após o consumo do alimento contaminado (DEL FAVA et al., 2010).

No ano de 1994, em um estabelecimento hípico de Brasília (DF), a ocorrência de um surto de LEME levou a óbito 41 de 58 animais, e análises posteriores comprovaram a contaminação da ração com fumonisina em concentrações entre 5 e 10 mg/kg (SALLES-GOMES et al., 2003). Além disso, em estudos realizados administrando FB₁ a cavalos (0,125 mg/kg/dia i.v., por 7 dias) lesões características de LEME foram encontradas no cérebro dos animais e o mesmo foi observado quando a FB₁ foi administrada aos cavalos por via oral (1,25 mg/kg a 4 mg/kg peso corporal, por 21 dias) (MARASAS et al., 1998; KELLERMAN et al., 1990).

Em estudos realizados por Osuchowski et al. (2005), com camundongos BALB/c fêmeas, após uma infusão intracerebroventricular de FB₁ (0,5 µl/h com doses totais de 0, 10 e 100 µg de FB₁, por um período de 7 dias), os animais que receberam a dose de 100 µg desenvolveram problemas locomotores ao longo do tratamento, como marcha instável, tremores e espasticidade das extremidades. Nestes camundongos foi observada neurodegeneração no córtex e astrócitos ativados no hipocampo.

Outro ponto que pode estar envolvido com a neurotoxicidade da FB₁ se relaciona com alterações em enzimas como a Ca²⁺ ATPase e a Na⁺K⁺ ATPase. A Ca²⁺ ATPase atua regulando as concentrações intracelulares de cálcio, mantendo-as baixas através do mecanismo de extrusão e assim, garantindo que os processos neuronais em que o cálcio está envolvido, tais como liberação de neurotransmissores, metabolismo energético, plasticidade sináptica e transição de genes essenciais para aprendizado e memória, ocorram de forma adequada (STREHLER & ZACHARIAS, 2001; BERRIDGE, 1998; BLACKSTONE & SHENG, 2002).

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O oxigênio é vital para a sobrevivência de todos os organismos aeróbios uma vez que durante o metabolismo em células normais, as moléculas de ATP são geradas a partir de moléculas de oxigênio, sendo este reduzido a água (redução de 4 elétrons) (KALYANARAMAN, 2013).

Em condições perfeitas, o oxigênio seria utilizado sem a produção de subprodutos tóxicos ou espécies reativas de oxigênio. No entanto, em condições fisiopatológicas que

causem danos às mitocôndrias, o mecanismo de transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial é prejudicada levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres (nem toda espécie reativa de oxigênio é um radical livre) (KALYANARAMAN, 2013; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

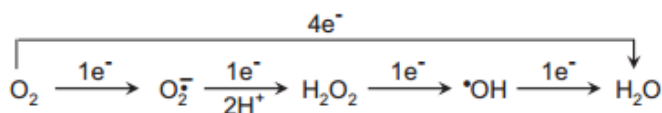


Figura 4 – Redução Sequencial de Oxigênio a Água.
Fonte: Kalyanaraman, 2013.

Apesar das EROs serem as que mais se destacam, também podem ser formadas durante o metabolismo, espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e espécies reativas de enxofre (EREs). Estas espécies reativas podem ser divididas em dois grupos: radicais livres e compostos não radicalares (MARTELLI & NUNES, 2014).

Os radicais livres são átomos e moléculas que apresentam pelo menos um elétron desemparelhado em seus orbitais externos, o que lhes confere poder oxidante, ou seja, para tornarem-se estáveis atacam outras moléculas, desencadeando uma reação em cadeia. Como exemplos de radicais livres podem ser citados o íon hidroxila (OH^-), íon peroxil (HOH^\cdot), ânion superóxido (O_2^-) e óxido nítrico (NO^\cdot). Já os compostos não radicalares, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl), não apresentam elétrons livres, sendo menos instáveis, mas ainda assim podendo reagir com outras moléculas (BIANCHI & ANTUNES, 1999; MARTELLI & NUNES, 2014).

Durante processos metabólicos essenciais no corpo humano os radicais livres e outras EROs ou ERNs podem ser geradas como produtos normais do metabolismo celular e fundamentais para que células, tecidos e órgãos exerçam adequadamente suas funções. Além disso, sabe-se atualmente que algumas dessas espécies participam do processo de sinalização celular, regulando vias de transdução de sinal que alteram a expressão gênica e contribuem para o crescimento, autofagia, apoptose ou a senescência celular (OGA, CAMARGO & BATISTUZZO, 2014).

As reações metabólicas que dão origem às espécies reativas podem ser reações enzimáticas, tais como reações da cadeia respiratória, fagocitose, síntese de prostaglandinas e sistema P450 ou reações não enzimáticas de oxigênio com compostos orgânicos. Também

podem colaborar para a formação de espécies reativas fontes externas, como poluentes ambientais, drogas, pesticidas, radiação, entre outros (LOBO et al., 2010).

Para que seja mantida a homeostase do organismo, existe um equilíbrio entre a produção e a neutralização das espécies reativas por antioxidantes e caso ocorra um desequilíbrio tendendo para a superprodução das espécies reativas, as células começam a sofrer danos, processo conhecido como estresse oxidativo (CAROCHO & FERREIRA, 2013). A geração excessiva de espécies reativas (EROs/ERNs) leva a danos em lipídios, proteína e ácidos nucleicos (OGA, CAMARGO & BATISTUZZO, 2014).

Segundo Lobo et al. (2010), o estresse oxidativo de curto prazo pode ocorrer em tecidos feridos por traumas, infecção, lesões pelo calor, toxinas e excesso de exercício. Além disso, o estresse oxidativo é correlacionado com o desenvolvimento de diversas patologias tais como doenças inflamatórias (artrite, vasculite, lúpus eritematoso), doenças isquêmicas (acidente vascular cerebral, doenças cardíacas), hipertensão, distúrbios neurológicos (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, distrofia muscular) e alguns tipos de câncer.

De modo a evitar que o estresse oxidativo ocorra, o organismo apresenta um sistema de defesa antioxidante que pode atuar de diferentes modos, tais como: impedindo a formação de radicais livres ou espécies não- radicais (sistemas de prevenção), impedindo a ação (sistemas varredores) ou favorecendo a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O sistema de defesa antioxidante pode ser dividido em sistema de defesa não enzimático, o qual é composto por substâncias produzidas pela própria célula (glutaciona, coenzima Q, ferritina, ácido alfa-lipoico, ácido úrico, entre outros) ou obtidas através da dieta (ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, alguns minerais, diversos compostos fenólicos) e sistema de defesa enzimático, composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), catalase (CAT) (SILVA & JASIULIONES, 2014).

Para avaliar o estresse oxidativo podem ser utilizados biomarcadores de estresse, como marcadores de danos oxidativos (proteínas ou lipídios oxidados, quebra de DNA) ou métodos baseados na capacidade antioxidante (capacidade antioxidante total, enzimas antioxidantes ou quantificação de antioxidantes não enzimáticos) (VASCONCELOS et al., 2007).

A avaliação do estresse oxidativo depende da habilidade de aferição da presença de espécies reativas, as quais podem ser medidas diretamente, por meio de sua concentração em fluidos biológicos e tecidos, ou indiretamente, através da avaliação do dano causado pelas mesmas (BARBOSA et al., 2008).

A aferição indireta das espécies reativas, através do dano causado pelas mesmas sobre biomoléculas (lipídios, proteínas ou DNA) é considerada uma boa alternativa para o monitoramento do estresse oxidativo, uma vez que a avaliação da magnitude do dano é considerada de maior relevância (BARBOSA et al., 2008).

Dentre os métodos utilizados para a avaliação do estresse oxidativo, estão a determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), do conteúdo de tióis não-proteicos (NPSH), conteúdo de ácido ascórbico, determinação do poder antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) e determinação de óxido nítrico indireto (NOx).

A determinação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é utilizada como parâmetro para avaliar o grau de peroxidação lipídica, uma vez que, os ácidos graxos (principais constituintes das membranas celulares e fonte de combustível metabólico) são particularmente vulneráveis à peroxidação pelo ataque por íons hidroxila (OH^-) (RODRIGUES, 2007).

A peroxidação lipídica dá origem a aldeídos insaturados que podem sofrer clivagem gerando cadeias menores de aldeídos que muitas vezes se encontram associados a outros grupamentos químicos. Dentre estes aldeídos formados encontra-se o malondialdeído (MDA), que em presença de ácido tiobarbitúrico (TBA) reage e forma um cromógeno de cor rosa que pode ser medido espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 532 nm (RODRIGUES, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

A glutathiona (GSH) consiste em um tripeptídeo linear de aminoácidos (glutamato, cisteína e glicina) sintetizada no interior das células. A cisteína apresenta em sua estrutura enxofre (denominado grupo tiol), componente que confere a GSH capacidade de desempenhar as funções que lhe são características e de fundamental importância para o organismo (NETO, 2010).

A glutathiona na sua forma reduzida é o tiol não proteico mais prevalente nas células animais e atua protegendo as mesmas dos processos oxidativos através da sua conjugação com espécies reativas (NETO, 2010). Desta forma, pode-se dizer que a determinação do conteúdo de tióis não-proteicos pode ser usada como um parâmetro representativo das concentrações de glutathiona presentes no organismo e conseqüentemente como um marcador antioxidante.

A determinação do conteúdo de tióis não-proteicos ocorre através de uma reação que emprega como substância cromogênica o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico), também conhecido como DTNB. A reação entre a glutathiona e o DTNB gera o ácido 2-nitro-5-

mercapto-benzóico (TNB) de coloração amarela que pode ser medido através de espectrofotometria em um comprimento de onda de 412 nm. Através desta reação, diferentes hidroperóxidos são monitorados como co-substratos da glutatona, sendo sua quantidade medida indiretamente pela diminuição da quantidade de GSH (ROVER, HÖER & VELLASCO, 2001).

Outro marcador antioxidante muito utilizado é a determinação do conteúdo de ácido ascórbico (AA). O AA, também chamado comumente de vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel e termolábil indispensável para o organismo. No entanto, os seres humanos e outros primatas, são incapazes de sintetizar o AA a partir da glicose pela deficiência genética da enzima gulonolactona oxidase e assim obtém o mesmo através da alimentação (MANELA-AZULAY et al., 2003).

No organismo, o AA encontra-se na forma de ascorbato, forma que atua como antioxidante neutralizando radicais livres através da doação de elétrons (ação redutora) e permitindo que estes recuperem a estabilidade, reduzindo potencialmente o estresse oxidativo (BARREIROS, DAVID & DAVID, 2006; PIRES, 2008).

A determinação do conteúdo de AA pode ser feita por um processo que envolve a derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Neste processo, o AA é oxidado pela presença de cobre formando ácido dehidroascórbico e ácido dicetogulônico, os quais quando tratados com 2,4-dinitrofenilhidrazina formam o derivado bis-2,4-dinitrofenilhidrazona que em presença de ácido sulfúrico sofre um rearranjo formando um produto cromógeno com uma banda de absorção que pode ser lida em 520 nm por espectrofotometria (OMAYE, TURNBULL & SAUBERLICH, 1979).

Outro método muito empregado em estudos envolvendo processos de estresse oxidativo, é o de avaliação do poder antioxidante pela redução do ferro (FRAP). Como o próprio nome sugere, este método é utilizado para avaliar a capacidade dos compostos antioxidantes (redutores) presentes no organismo frente a compostos oxidantes, baseando-se no fato de que a habilidade de um composto em produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} define sua força antioxidante (VASCONCELOS et al., 2007).

Em baixas valores de pH, é avaliada a redução de um complexo Fe^{3+} -TPTZ (ferritripiridiltriazina) a Fe^{2+} -TPTZ (ferroso-tripiridiltriazina) pelos agentes redutores (antioxidantes). Este complexo Fe^{2+} -TPTZ formado apresenta uma coloração azul intensa que pode ser medida em um comprimento de onda de 593 nm em espectrofotômetro (BENZIE & STRAIN, 1996).

Deve-se levar em consideração na análise utilizando o FRAP, que este é um método com algumas limitações, uma vez que nem todo composto que é capaz de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} é um antioxidante e, da mesma forma, nem todo antioxidante tem a habilidade específica para reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} (VASCONCELOS et al., 2007).

O óxido nítrico (NO) pode ser considerado o principal representante das ERNs presentes no organismo e seu papel ainda é muito discutido, pois algumas vezes é benéfico e outras prejudicial ao organismo. Deve-se considerar que a toxicidade do NO é observada particularmente em casos de estresse oxidativo, onde este atua como um radical livre (VASCONCELOS et al., 2007; DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003).

A metabolização do NO em plasma e tecidos é extremamente rápida, resultando da formação de produtos estáveis (nitrito e nitrato). Pela metabolização ocorrer de forma muito rápida, a detecção do NO em amostras biológicas é extremamente difícil e a determinação direta emprega metodologias complexas. Desta forma, as metodologias indiretas são as mais utilizadas, baseando-se na detecção dos produtos de metabolização do NO, que são o nitrito e o nitrato (DUSSE, VIEIRA & CARVALHO, 2003).

O método mais utilizado para a determinação de nitrito e nitrato a partir do NO é baseado na reação de Griess, que consiste em uma reação de diazotização em que o ácido sulfanílico reage com o nitrito em condições ácidas para formar um cátion de diazonio que se acopla com a α -naftilamina para formar um diazo composto que é estável durante alguns minutos em solução aquosa e absorve luz em uma faixa em torno de 540 nm (TSIKAS, 2005).

2.4.1 Estresse Oxidativo e Fumonisinás

A toxicidade da FB_1 , pode ser relacionada com o desenvolvimento de quadros de estresse oxidativo, especialmente com o aumento da produção de EROs. A relação entre o estresse oxidativo e a FB_1 podem desempenhar papel importante na indução de danos a lipídios, DNA e proteínas (WANG et al., 2016).

Nos últimos anos diversos estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, tem sido realizados de modo a avaliar a relação entre a FB_1 e o desenvolvimento de quadros de estresse oxidativo, bem como a avaliação dos danos resultantes deste processo ao organismo.

Bernabucci et al. (2011), realizaram um estudo *in vitro* com o objetivo de avaliar os efeitos causados pela FB_1 (0, 35 e 70 $\mu\text{g/mL}$) e AFB_1 (0,5 e 20 $\mu\text{g/mL}$) sobre o estado oxidativo de células mononucleares de sangue periférico bovino incubadas durante 2 e 7 dias. Neste estudo foi observado um aumento das concentrações de EROs independente do tempo

de tratamento e das concentrações das micotoxinas. Os níveis de MDA intracelular para FB₁ mostraram elevação dependente da dose, sendo maiores na concentração de 70 µg/mL, o que não foi observado para os níveis de tióis intracelulares, que apresentaram diminuição na dose mais alta. Os genes de expressão citoplasmática de SOD e GPx também mostraram redução significativa nas células tratadas com FB₁ dependente da dose, tanto em 2 quanto em 7 dias de tratamento.

Outro estudo *in vitro* foi realizado por Mary et al. (2012) utilizando células mononucleares de baço de ratos Wistar, com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição a FB₁ (10 µM), AFB₁ (20 µM) e a associação de ambas sobre o estado oxidativo celular quando expostas por um período de 48 horas. Para todos os tratamentos avaliados houve aumento das EROs totais e oxidação de biomoléculas, além disso o complexo mitocondrial I, o CYP450, sistema NADPH oxidase e o metabolismo do ácido araquidônico mostraram-se envolvidos com a geração de radicais livre relacionados à FB₁.

Domijan et al. (2008) avaliaram os possíveis danos ao DNA e estresse oxidativo causados pela administração oral única de FB₁ (5, 50 e 500 µg/kg p.c.) em um intervalo de 4, 24 e 48 horas em fígado de ratos Wistar adultos. Apesar de os parâmetros de estresse oxidativo não terem sido afetados por este tratamento, danos ao DNA dependentes da dose e do tempo foram observados.

Em estudo realizado por Abbes et al. (2015), utilizando camundongos Balb/c fêmeas observou-se um decréscimo no conteúdo de GSH, GPx e SOD após exposição dos animais por duas semanas a FB₁ (100 µg/kg p.c.) por via oral. Da mesma forma, Poersh et al. (2014), ao avaliarem alterações de marcadores enzimáticos e não-enzimáticos de estresse oxidativo em frangos, demonstraram que a administração de uma dieta contaminada com FB₁ (100 mg/kg p.c.) durante 21 dias, resultou em aumento dos níveis de TBARS, concentração de ácido ascórbico e aumento da catalase hepática.

Abdellatef & Khalil (2016) avaliaram marcadores de estresse oxidativo em ratos Sprague-Dawley machos adultos após a administração de FB₁ (50, 100 e 200 mg/kg p.c.) na dieta e observaram um aumento significativo dos níveis de MDA, NOx, no estado antioxidante total (TOS) e no índice de estresse oxidativo (OSI), acompanhada de uma diminuição significativa no conteúdo de GSH e atividade de SOD e na capacidade antioxidante total (TAC) nos tecidos hepático e renal. Além disso, os mesmos autores observaram que a alteração nos parâmetros de estresse oxidativo ocorriam de forma dose-dependente.

Ainda, Nadjia e Laraba-Djebari (2015), realizaram indução tumoral hepática em camundongos NMRI através de doses de FB₁ (10µg a 100 µg/20g p.c.) administradas por via intraperitoneal por 21 dias, associadas a uma pré administração de fenobarbital (0,05% na dieta). Após sete meses da indução tumoral por FB₁, foi observado um desequilíbrio do estado oxidativo, caracterizado pelo aumento nos níveis de mediadores oxidantes (MDA e NOx) e antioxidantes (GSH e catalase), associados a alteração do DNA. Segundo os autores, esta elevação tanto nos níveis de mediadores oxidantes quanto antioxidantes, pode refletir uma hiper-ativação do metabolismo dos hepatócitos, e que a carcinogenicidade mediada pela FB₁ provavelmente seria induzida em conjunto com o estresse oxidativo.

Os estudos citados demonstram a forte correlação existente entre a ingestão de FB₁ e alterações nos parâmetros de estresse oxidativo, bem como a grande variação existente nos resultados de acordo com o tempo, espécie e a dose de FB₁ utilizados, o que destaca a importância da realização de mais estudos buscando elucidar a relação existente entre este processo e os danos causados à saúde.

2.5 APRENDIZADO E MEMÓRIA

Segundo Lent (2005), aprendizagem e memória, apesar de estarem intimamente interligadas, são consideradas distintas, uma vez que a aprendizagem se relaciona apenas ao processo de aquisição de informações, já a memória também engloba a retenção e recordação das informações adquiridas.

A memória pode ser classificada em memória imediata ou sensorial com duração de apenas alguns segundos, memória de curta duração com duração de alguns minutos ou poucas horas e memória de longa duração, a qual pode ter duração de horas, dias ou anos, sendo esta a responsável pelo registro do passado e armazenamento do conhecimento (IZQUIERDO & MCGAUGH, 2000; SQUIREL & KANDEL, 2003).

O processo de formação da memória envolve várias estruturas cerebrais e cada etapa dos múltiplos sistemas de memória é ativada pela atuação de estruturas cerebrais específicas. No processo de codificação ou aquisição que se refere ao processo de elaboração da informação a ser armazenada, as estruturas da região límbica são as mais envolvidas. Na etapa de consolidação ou armazenamento, em que é feita a retenção da informação a ser armazenada, o hipocampo age em comunicação com o córtex possibilitando a reverberação da

informação a ser armazenada o que é imprescindível para o processo de consolidação (ESTRELA & RIBEIRO, 2012).

Estudos sugerem o envolvimento do estresse oxidativo na modulação de processos cognitivos (ABIDIN et al., 2004; SILVA et al., 2004). Desta forma, visto que a FB₁ é correlacionada com o desenvolvimento de processos de estresse oxidativo, busca-se avaliar se a mesma pode apresentar algum tipo de prejuízo em testes de aprendizagem e memória.

2.6 ANSIEDADE, MEDO E COMPORTAMENTO DEPRESSIVO

A ansiedade se caracteriza como um estado emocional desconfortável de antecipação de um perigo iminente, podendo ser traduzido como um medo sem objetivo. Já o medo pode ser conceituado com um estado gerado pela presença real de um objeto ou situação ameaçadora que, na ansiedade não existiria (PEREGRINO, 1996).

A ansiedade e o medo são considerados patológicos quando são exagerados, desproporcionais em relação ao estímulo, interferindo na qualidade de vida, desempenho diário ou conforto emocional do indivíduo (CASTILLO et al., 2000).

Diversos modelos animais foram desenvolvidos e padronizados ao longo dos anos para o estudo experimental da ansiedade em humanos, uma vez que parece existir uma correspondência muito grande entre as espécies em relação aos mecanismos neurais e funções comportamentais subjacentes a esta emoção (CRUZ & LADEIRA-FERNANDEZ, 2012).

A antecipação de uma situação de perigo tem início com processos perceptuais mediados por duas classes de estímulos. A primeira sinaliza de forma inata para todos os membros de uma mesma espécie algum grau de perigo no ambiente, deflagrando reações de defesa sem qualquer aprendizagem prévia. Já a segunda classe, compreende estímulos que passam a sinalizar perigo após aprendizagem decorrente da interação do organismo com o ambiente, fazendo com que o animal passe a reagir defensivamente na presença do novo estímulo (CRUZ & LADEIRA-FERNANDEZ, 2012).

Os modelos animais de ansiedade procuram reproduzir situações de perigo ou desconforto potencial e desta forma, os padrões comportamentais e as reações fisiológicas ativadas em decorrência destas situações, são utilizadas como medida de ansiedade e geralmente representam grande correspondência com as medidas de ansiedade em humanos (TREIT, 1985). Desta forma, pretende-se avaliar possíveis efeitos de ansiedade em animais após tratamento com FB₁ correlacionando os mesmos a possíveis efeitos em humanos.

A depressão é o mais comum dos distúrbios afetivos, afetando milhares de pessoas em todo o mundo, sendo causa de incapacidade e morte prematura. A depressão pode variar de uma forma muito leve, beirando a normalidade, à depressão grave, acompanhada por alucinações e delírio (RANG et al., 2012).

Alguns critérios comportamentais e cognitivos específicos geralmente são apresentados por pacientes depressivos, tais como humor deprimido, anedonia, distúrbios locomotores e de ansiedade, pensamentos de morte e suicídio (BARTOLOMUCCI & LEOPARDI, 2009). Alguns destes sintomas podem ser reproduzidos em modelos animais de modo a avaliar a indução do comportamento depressivo por substâncias específicas ou mesmo o tratamento de distúrbios depressivos por outras.

As principais teorias bioquímicas sobre a depressão relacionam-se com disfunções em neurotransmissores cerebrais e seus receptores, embora outras áreas ainda estejam em investigação. Quanto aos neurotransmissores cerebrais, a principal teoria envolve a das monoaminas, onde a deficiência de aminas biogênicas como a serotonina (5HT), dopamina (DA) e norepinefrina (NE) seria a causa da depressão. Já em relação aos receptores, diversos estudos têm postulado que alterações funcionais em receptores de aminas biogênicas relacionam-se com o desenvolvimento da depressão (BAHLS, 1999).

As possíveis alterações nas aminas biogênicas causadas pela exposição à FB₁ foram investigadas utilizando camundongos BALB/c tratados durante cinco dias com FB₁ por via subcutânea na região cervical (0, 0.25, 0.75, 2.25 e 6.75 mg/kg/dia p.c). Estes, apresentaram elevação significativa nas razões ácido homovanílico/dopamina e ácido 5-hidroxi-indolacético/serotonina em várias regiões do cérebro (TSUNODA et al., 1998).

Em estudo realizado por Porter et al. (1993), ratos machos e fêmeas receberam FB₁ na alimentação durante 4 semanas (15, 50 e 150 mg/kg) e não foram verificadas diferenças nas concentrações cerebrais de norepinefrina, dopamina, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido 3-metoxitiramina, ácido homovanílico, serotonina (5HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5HIAA) e as razões 5HIAA/5HT em nenhum dos sexos. Quando comparados entre os sexos, as proporções norepinefrina/dopamina diminuíram nos animais tratados com a concentração de 150 mg/kg sugerindo que a FB₁ perturba a homeostase de norepinefrina e/ou dopamina cerebral.

Dentre os vários tipos de transtornos afetivos existentes, parecem existir diversas características celulares e comportamentais bastantes semelhantes, sendo o estresse oxidativo um dos aspectos considerados. O dano oxidativo mostrou-se presente com bastante frequência

em diferentes transtornos afetivos, como na depressão, ansiedade, transtorno bipolar e transtorno do pânico, o que pode ser relacionado com uma maior vulnerabilidade do sistema nervoso central aos danos oxidativos (BALMUS et al., 2016).

Além disso, estudos sugerem que alterações no metabolismo de esfingolipídios podem ter relação com desenvolvimento de quadros de ansiedade e depressão, uma vez que os mesmos desempenham papéis importantes na sinalização e internalização de neurotransmissores (MÜLLER et al., 2015).

Uma vez que a FB₁ é relacionada ao desenvolvimento de quadros de estresse oxidativo, disfunção no metabolismo dos esfingolipídios e alterações em aminas biogênicas, faz-se necessário investigar uma possível correlação entre a mesma e o desenvolvimento de quadros de ansiedade e depressão.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos tóxicos causados pela exposição repetida à Fumonisina B₁ correlacionando déficits locomotores, de memória e ansiedade, bem como dano celular através de marcadores bioquímicos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Artigo 1:

3.2.1.1. Determinar se a Fumonisina B₁ altera o peso corporal e o peso relativo dos órgãos dos animais tratados em relação aos animais controle;

3.2.1.2. Determinar se a Fumonisina B₁ causa alteração em indicadores não-enzimáticos de estresse oxidativo em fígado, rim e pulmão: ácido ascórbico, tióis não proteicos (NPSH), peroxidação lipídica (TBARS), poder antioxidante do ferro reduzido (FRAP) e óxido nítrico (NO_x);

3.2.2. Artigo 2:

3.2.2.1. Determinar se a Fumonisina B₁ altera o comportamento motor e exploratório no teste de campo aberto;

3.2.2.2. Determinar se a Fumonisina B₁ afeta a ansiedade dos animais nos testes de campo aberto, construção de ninho e Bolinhas enterradas;

3.2.2.3. Determinar se a Fumonisina B₁ interfere na capacidade de aprendizado e memória dos animais, através de parâmetros quantificados no teste de reconhecimento de objetos;

3.2.2.4. Determinar se a Fumonisina B₁ causa alteração em indicadores não-enzimáticos de estresse oxidativo em córtex cerebral e hipocampo: tióis não proteicos (NPSH) e poder antioxidante do ferro reduzido (FRAP);

3.2.2.5. Determinar a imunoreatividade da proteína quinase C (PKC-Ser957) em hipocampo.

4. ARTIGO 1

Effects of repeated fumonisin B₁ exposure on markers of oxidative stress in liver, kidneys and lung of C57BL/6 mice

MICHELI DASSI^a, ANA C. M. BRAGA^b, NAIÉLI S. SOUTO^a,
MAYARA L. FREITAS^b, CLARISSA VASCONCELOS^b, VIVIANE N. ZORZI^c
MAURO S. OLIVEIRA^b, ANA F. FURIAN^{a,b*}

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

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

*^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria,
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.*

***Manuscript submitted to Journal of Environmental Science and Health, Part B
(Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes)***

Abstract

Fumonisin B₁ (FB₁) is the main mycotoxin that contaminates maize and maize-based products. It is related to several toxic effects to human and animal health, and such effects are dependent of dose and specie. The objective of the present study was evaluate the effects of FB₁ (8 mg/kg, i.p. for 4 days) exposure in body weight and oxidative stress parameters in in liver, kidney and lung of C57BL/6 male mice. After treatment, organs were dissected, removed and weighted. The organ-to-body weight ratio, organ-to-adrenal gland weight ratio and organ-to-brain weight ratio were calculated. Thiobarbituric acid reactive species (TBARS), non-protein thiol groups (NPSH), antioxidant power by the iron reduction method (FRAP), ascorbic acid content and indirect nitric oxide levels (NO_x) were evaluated. The results showed an increase in NPSH levels in the liver and lungs, decrease in FRAP content in liver and kidneys, without any significant alteration in the levels of TBARS, ascorbic acid and NO_x content. No alteration on organs weight and relative to body, adrenal-gland and brain weight were observed. In summary, four days of exposure to FB₁ on C57BL/6 male mice induced an imbalance in antioxidant defenses in liver, kidneys and lungs without any alteration in organs weight.

Keywords: mycotoxins, toxicity, antioxidant defense, non-protein thiol groups

Introduction

Mycotoxins are toxins produced by several species of fungi during their secondary metabolism. ^[1] These toxins cause serious damage to human and animal health. ^[2]

Contamination by fumonisin B₁ (FB₁) is extremely common since they are natural contaminants, present in several products, especially cereals and their derivatives.^[1]

Among the several mycotoxins, FB₁ is considered the main contaminating mycotoxin in maize (*Zea mays L.*) and maize-based products. The fungi belonging to the genus *Fusarium* are related to the production of FB₁, among the species that stands out is *Fusarium verticillioides*, besides *Fusarium proliferatum*, *Fusarium nygamai* and *Fusarium fujikuroi*.^[3] The process of maize contamination by fungi begins in the field, and continues in the harvesting, drying, storage, transport and processing stages.^[4] These process is very frequent and difficult to control, which favors the exposure of humans and animals.

The exposure of humans and animals to FB₁ has been related with the cause of several pathologies, which are clinically manifested in different ways according to the species affected.^[5] In animals, several clinical manifestations are related to FB₁, such as development of equine leukoencephalomalacia (LEME),^[2] pulmonary edema and cardiotoxicity in pigs,^[6] nephrotoxicity and hepatotoxicity,^[7,8,9] neurological changes^[10] and immunological damage^[11] in several species studied.

In humans, although there is no direct evidence of damage,^[12] exposure to FB₁ is related with beginning of rickets in children,^[13] increased risk of defects in the neural tube of infants associated with the consumption of food contaminated by pregnant women.^[14] As well as reports of the relationship between exposure to FB₁ and the development of hepatic, renal, neural and cardiac damages.^[15]

In addition, FB₁ is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible human carcinogen (Group 2B).^[16] Although it does not cause direct damage to DNA, the induced effects in the organism, such as the formation of reactive oxygen species, can lead to DNA damage favoring the development of cancer.^[17]

The mechanism of toxicity through which FB₁ acts is explained in particular by the changes in the metabolism of sphingolipids through the inhibition of the enzyme ceramide synthase, responsible for the conversion of the sphingoid bases to sphingolipids [18; 2]. They act in the control of diverse functions in the organism, such as growth, differentiation and cellular communication, control of proteins and membranes, being that changes caused in the metabolism of the same can result in extremely serious damages. [19, 20]

In addition, FB₁ toxicity is related to the development of oxidative stress, which damage to lipids, proteins and DNA.[21] Poersch et al. (2014) [22] demonstrated the FB₁ diet (100 mg/kg b.w.) for 21 days increased hepatic thiobarbituric acid reactive species (TBARS) levels, vitamin C content and catalase (CAT) activity. Superoxide dismutase (SOD), Glutathione S-transferases (GST) and non-protein thiols (NPSH) levels, in the liver were not altered by the mycotoxin-contaminated diet in broiler chicks. Additionally, Poersch et al. (2015) [23], showed that FB₁ (8 mg/kg, i.p) causes brain hyperexcitability in vivo and increase in the $\Delta\Psi_m$ in cerebral cortex of C57BL/mice. A study by Amira and Ashraf (2016) [24] with Sprague Dawley rats, FB₁ (50, 100 and 200 mg/kg diet) increased malonaldehyde (MDA), nitric oxide and decreased GSH content, SOD activity, and total antioxidant capacity in liver and kidney tissues, especially at high-dosage of FB₁. However, Domijan et al. (2008) [25] used a single orally dose of FB₁ (5, 50 and 500 μ g/kg b.w.) to adult male Wistar rats and no change in oxidative stress markers were observed. In this way, it can be noted that several factors influence the effects observed after exposure to FB₁, such as differences in protocols, age, doses and species.

In addition, to the best of our knowledge, it is the first study that investigate the effect of FB₁ on organs weight and relative organ-body weight ratios, that are indicators of toxicological damage. In this context, the objective of this study was to evaluate the effects

caused by the exposure to FB₁ in the organs weight as well as in oxidative stress markers in liver, kidneys and lungs of C57BL/6 male mice.

Materials and methods

Animals and reagents

Twenty male C57BL/6 mice (60 days old, 20-30g) from the breeding colony of the Federal University of Santa Maria were used. Animals were maintained in polypropylene boxes of 41 x 34 x 16 cm (maximum 8/box) under controlled light conditions - light / dark cycle of 12 hours and temperature (22 ± 2 °C), with food and water *ad libitum*. 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 (CEUA n° 6775010416).

Analytical standards of FB₁ and reagents for determination of oxidative stress indicators was obtained from Cayman Chemical (Michigan, USA) or Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals was obtained from Sigma-Aldrich or equivalent quality.

Experimental design and sampling

Animals were divided into two groups: vehicle and FB₁. Vehicle group received a solution of saline and DMSO (0.9% NaCl and DMSO 1.6%, i.p., 10 ml/kg), and FB₁ animals were administered with FB₁ (8 mg/kg, i.p., 10 ml/kg). Each group received four doses, with a

24-hour interval. The dose and schedule for FB₁ administration was chosen based in previous studies. [26, 23]

Organ weights and ratios

After four day-exposure to FB₁ or vehicle, animals were euthanized, the organs (adrenal-gland, brain, epididymis, heart, kidney, liver, lung, spleen and testicles) were dissected, removed and weighed. Accordingly to the wet weight (absolute weight) and body weight at necropsy, the organ-to-body weight, organ-to-brain weight or organ-to-adrenal-gland weight ratio (relative weight) were calculated as a toxicological parameter.

Biochemical analysis

Non-protein thiol (NPSH) determination

The content of non-protein thiols was determined according to the methodology described by Ellman (1959) [27] with some modifications. Samples were precipitated with TCA (10%), centrifuged at 3000 g for ten minutes at 4 °C. After the centrifugation the supernatant was placed in a medium containing potassium phosphate buffer (1M, pH 7.4), DTNB (10 mM). The samples were read in a spectrophotometer at the wavelength of 412 nm. The results were calculated in relation to a standard curve constructed with cysteine and corrected for the protein content. The results were calculated as nmol NPSH/mg protein.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) determination

TBARS was performed according to methodology described by Ohkawa et al. (1979)^[28] with some modifications. The samples were centrifuged at 3000 g for ten min. at 4 °C and the supernatant (80 µL) was incubated with 460 µl of a mix containing thiobarbituric acid 0.8%, acetic acid buffer (2.5 M, pH 3.4), SDS 8.1% and water for 2 h at 95 °C. After cooling to room temperature, the absorbance in the supernatant was measured at 532 nm. The results were calculated as nmol MDA/mg protein.

Ascorbic acid determination

The determination of ascorbic acid content (vitamin C) was according to the methodology described by Jacques-Silva et al. (2001)^[29] where the homogenized tissues were precipitated with TCA 5% (1:2), centrifuged at 3000 g for 10 min. at 4°C and the supernatant (300 µL) incubated at 37°C for 3 h with TCA 13.3% and a color reagent containing dinitrophenylhydrazine (DNPH), thiourea and CuSO₄. The reaction was quenched by addition of 65% H₂SO₄ (v/v). The reaction product was determined spectrophotometrically at 520 nm and the results calculated as nmol of ascorbic acid/mg of protein.

Antioxidant power of iron reduction (FRAP) determination

The antioxidant power was analyzed in the samples by the iron reduction method described by Benzie and Strain (1996),^[30] where the supernatant of the tissue samples were incubated at 37°C for 60 min. in the presence of ferrous sulfate heptahydrate (20 mM) and 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) in acid medium, resulting in the formation of an intense

blue complex (Fe^{2+} -TPTZ). The reaction product was measured in a spectrophotometer at a length of 593 nm and the results shown in nmol Fe^{2+} /mg of protein.

Indirect nitric oxide (NOx) determination

NOx determination was performed in the samples according to the methodology described by Miranda et al. (2001).^[31] The methodology is based on the quantification of nitric oxide metabolites (nitrate and nitrite) through the reduction of vanadium nitrate (III) and Griess reaction, in which the nitrite ion reacts with the sulfanilamide in acid medium to form a diazonium salt that is reacted with N- (1-naphthyl) ethylenediamine hydrochloride (NEED) to form a pinkish colored diazocomposite. To perform the test, after determination of the protein, 200 μL of supernatant were incubated at 37°C for 60 min. with a standard solution of NaNO_3 100 μM , VCl_3 , sulfanilamide and NEED. The reaction product was read in a spectrophotometer at 540 nm and the results shown in nmol of NO_2 / mg of protein.

Protein determination

The quantification of proteins was performed according to the colorimetric method described by Bradford (1976).^[32]

Statistical analysis

Graphpad prism 5.0 software was used for statistical analysis and for plotting graphs. Statistical analysis was carried out by the Student's *t* test, and $P < 0.05$ was considered significant. All data are reported as mean and S.E.M.

Results and discussion

Weight of animals and body weight

In order to investigate the possible toxicological effect of FB₁ in other organs that are not related as “target actions of FB₁”, as well as to perform a toxicological study of FB₁ toxicity, we determine the weight and relative organ-body weight ratios. After four days of FB₁ or vehicle treatment, adrenal-gland, brain, epididymis, heart, kidney, liver, lung, spleen and testicles were dissected, removed and weighed, as shown in (Table 1). The analysis of the effect of FB₁ on organ weight, organ-to-body weight, organ-to-brain weight or organ-to-adrenal-gland weight ratio did not show any significant difference between the groups (Table 2).

A number of factors have been reported that may influence animal organ weights including strain of animal, age, sex and environmental and experimental conditions.^[33] So, alterations in weight and relative organ-body weight ratios could be considered an index of toxicity by xenobiotics.^[34] In this protocol, FB₁ do not produce any alteration on weight of organs or relative organ-body weight ratios. In addition, a study by Szabó et al. (2014),^[35] FB₁ was administered to rabbits through the diet, at a dose of 10 mg/kg for four weeks, with no significant change in body weight and total organ weights of treated animals compared to controls. Similarly, in a study by Denli et al. (2015),^[36] after administration of FB₁ (15 mg/kg feed) for seven days to Sprague-Dawle male rats, no change in body weight gain was observed for treated animals compared to controls. However, El-Neekety et al. (2007)^[37] observed a reduction in body weight of treated rats with a diet contaminated with fumonisins (200 mg/kg) for three weeks. Accordingly, the nonsignificant changes in the weights of the

liver, kidney and lung suggest that these organs neither were adversely affected nor produced treatment-related signs of toxicity. So, in this context, the data reported in this study was consistent with other authors, even with different protocols of exposition, dose and species.

Biochemical Analysis

Regarding the role of oxidative stress on FB₁ toxicity, in this protocol of exposition we investigated through the determination of NPSH, FRAP, TBARS, NO_x and ascorbic acid content on liver, kidney and lung the effect of FB₁ in this exposure protocol.

Statistical analysis showed that NPSH levels increased in liver [$t(18)= 2.557$; $P= 0.0198$] and lung [$t(18)= 2.105$; $P= 0.0496$] of FB₁ exposed animals (Figs. 1A e 1C, respectively), but there was no alteration in renal levels [$t(18)= 0.8968$; $P= 0.3816$] (Fig. 1B).

Additionally, statistical analysis showed a significant decrease in the FRAP content in the liver [$t(18)= 3.594$; $P= 0.0021$] and kidney [$t(18)= 2.193$; $P= 0.0417$] of FB₁ exposed animals (Figs. 2A and 2B, respectively). Lung FRAP content do not differ between groups [$t(18)= 0.9197$; $P= 0.3699$] (Fig. 2C).

However, no significant difference were observed in TBARS, ascorbic acid and NO_x content, in liver, kidney and lung in FB₁ treated mice when compared with vehicle group (Tables 3, 4 and 5, respectively).

Oxidative stress has been suggested as a possible mechanism of FB₁ toxicity. It can be defined as a change in the balance of pro-oxidants and antioxidants in the body, caused by the increase in the production of reactive oxygen species (ROS).^[38] The generation of reactive species can occur as a product of normal cellular metabolism.^[39] In addition, external sources such as environmental pollutants, drugs, pesticides, radiation among other factors may

contribute to the formation of reactive species. ^[40] Mycotoxins may be included in the external factors that contribute to the development of oxidative stress and by these they induce toxicity in many species.

In the present study, we analyzed alterations caused by the administration of FB₁ on oxidative stress parameters in different organs of mice. NPSH content can be considered the concentration of glutathione (GSH) present in the organism. A significant increase in NPSH content in liver and lung was observed in the FB₁ group, with no significant changes at the renal tissue. Effects of FB₁ administration on the levels of non-protein thiols and especially GSH are variable and therefore it is difficult to conclude the specific action of this mycotoxin. Hassan et al. (2015), ^[41] observed a reduction in hepatic and renal GSH content when FB₁ (100 µg/kg b.w.) was administered for 12 weeks to rats. Already, in a study performed by Bernabucci et al. (2011), ^[42] the levels of non-protein thiols in bovine peripheral blood mononuclear cells were evaluated after incubation with FB₁ (0, 35 and 70 µg/ml) for two and seven days, with no effect on NPSH content. Rumora et al. (2007) ^[43] performed a study with FB₁ (0.5 mg/kg, i.p.) to Wistar rats for two and seven days, and observed increased GSH levels in liver after seven days of treatment, while the renal GSH levels decreased. According to the authors, the liver and lungs are the main sites of GSH synthesis, which would explain the significantly elevated NPSH levels found in the present study. Elevated levels of NPSH in these two organs after FB₁ exposure could represent a defense mechanism to reduce the oxidative stress induced by mycotoxin.

Another antioxidant parameter evaluated was the FRAP. The FRAP test is used as a method to directly evaluate the “total antioxidant power” of the samples and is based on the ability of the antioxidants present in the sample to promote the reduction of Fe³⁺ present in the 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) complex to Fe²⁺. ^[30] Significant decrease in total antioxidant power in liver and kidney of FB₁ treated animals was observed, with no alteration

in lung. A decrease in FRAP would represent a decrease in the power or ability of the antioxidants present in the body to neutralize the reactive species generated. According to Vasconcelos et al. (2007),^[44] not all antioxidants could reduce Fe^{3+} , such as GSH. This theory corroborates with the results found in the present study, once, even though there was an increase in hepatic NPSH concentrations, there was a reduction in total antioxidant capacity.

In the same line of view, we determine ascorbic acid content. Ascorbic acid is normally found in the body as ascorbate which can act as an antioxidant being oxidized by reactive species present in the body, but may also have pro-oxidant properties, since Fe^{2+} and Cu^+ ions, which can be formed after reduction of transition metals (Fe^{3+} and Cu^{2+}) by ascorbate react with hydrogen peroxide forming the hydroxyl radical.^[45] When ascorbate is oxidized the semidehydroascorbate radical is produced, which is not considered a reactive specie because its unpaired electron is energetically stable. The semidehydroascorbate can be converted to ascorbate or two molecules of it can undergo disproportionation causing dehydroascorbate and regenerating an ascorbate molecule. The dehydroascorbate can be rapidly converted to ascorbate by the oxidation of GSH that becomes reduced.^[45, 46] Thus, a possible hypothesis for non-change in ascorbic acid levels in the present study is that, once a significant increase in NPSH concentration was observed, the concentrations of GSH present would be sufficient to allow maintenance of normal concentrations of ascorbate. In addition, Poersch et al. (2014),^[22] demonstrated the FB_1 diet (100 mg/kg b.w.) for 21 days to broiler chickens increased hepatic levels of ascorbic acid. However, the authors could not conclude whether this increase in ascorbic acid levels would contribute negatively or positively to the toxicity of FB_1 , once although it acts as an antioxidant, elevated levels of hepatic ascorbic acid may contribute to a pro-oxidant effect.

In addition to the determination of the antioxidant markers, the analysis of TBARS is a parameter of great importance in the evaluation of oxidative stress. Through the analysis of

TBARS it is possible to evaluate the degree of lipid peroxidation in the samples. ^[47] No alteration in the content of TBARS was observed in any of the organs analyzed, which could be related with the short time of treatment, agreeing with that quoted by Venkataramana et al. (2014) ^[48] that MDA would be a late marker of oxidative stress and cell damage, which can also be proven by the study by Nadjia and Laraba-Djebari (2015), ^[49] where MDA levels show high even after seven months of FB₁ administration.

Nitric oxide can be considered one of the main reactive nitrogen species found in the body, however its actions may be beneficial or harmful, since it can act both as an oxidizer and as a reductant. When NO oxidation forms nitrite and nitrate, these metabolites can be quantified ^[44, 50] In the present study, the determination of indirect nitric oxide did not demonstrate significant alteration in any of the organs tested after administration of FB₁. In contrast, in a study by Amira et al. (2016) ^[24] using Sprague-Dawley rats, after administration of FB₁ through the contaminated diet (50, 100 and 200 mg/kg) for four weeks, there was a significant increase in NO_x levels in liver and kidney. NO has a high affinity for heme found in plasma proteins, but is also capable of binding to -SH forming thiol groups (nitrosothiol), which serves as a transport vehicle for NO in plasma by increasing the physiological half-life of the NO in the organism. ^[51, 52] Thus, the observed increase in NPSH concentrations would justify that no changes in NO_x levels were observed, likely by the nitrosothiol groups formation. However, Nadjia and Laraba-Djebari (2015) ^[49] used decreasing doses of FB₁ (from 100µg to 10µg/20g b.w., i.p.) for 21 days to induce an experimental model of hepatic tumor in NMRI mice. Seven months after induction they show increased MDA and NO_x content, as well as increased GSH and CAT activity, associated with DNA damage in hepatic tissue. These findings demonstrate that the carcinogenicity mediated by FB₁ probably occurs with development of oxidative stress.

The presence of FB₁ in many food products and principally corn-based products, is a concern all over the world. Toxicity induced by this micotoxyn did the International Agency for Research on Cancer (IARC) classify FB₁ in group 2B, as a possible carcinogenic compound for humans. In addition, WHO establish a tolerable daily intake of 2 µg/kg (or 0.002 mg/kg) b.w. /day for FB₁, FB₂ and FB₃ alone or in combination.^[14] Considering the dose used in the present study in mice (8 mg/kg b.w.) to humans, according to the formula described by Reagan-Shaw et al. (2007),^[53] it would correspond to 0.65 mg/kg, thus, taking as an example, an adult of 70 kg, our dose would correspond to an intake of 45 mg of FB₁, much higher than the tolerable daily intake for a man of the same weight (0.14 mg/kg FB₁). So, this dose was used to simulate occasional high concentration cases of FB₁, since the concentrations of FB₁ into corn and derived products intended for human consumption would not be sufficient to reach this concentration in a single exposure.^[54] Additionally, all sorghum and maize samples presented *Fusarium sp.* and contained fumonisin B1 in the range of 0.14-7.8 mg/kg and 0.25-64.7 mg/kg, respectively.^[55] Regarding this point, it is possible that intake of a considerable amount of highly-contaminated food could result in acute FB₁ poisoning near the dose range used in the present study.

Conclusion

Exposure to high doses of FB₁, even for a short period of time, display harmful effects as demonstrated by an increase in NPSH levels in the liver and lungs and decrease in FRAP content in liver and kidneys, which could contribute or even predispose the mechanisms of toxicity related to this mycotoxin. So, more studies involving other protocols of exposition (dose and time) needs to be performed.

Acknowledgements

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS grant #16/2551-0000365-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grant #471653/2013-6). M.D., M.S.O., and A.F.F. are the recipients of CNPq fellowships; A.C.M.B., M.L.F are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships. Authors thank Dr Carlos Fernando de Mello for providing laboratory facilities. We also thank to Viviane Nogueira Zorzi for their technical assistance.

References

- [1] Iamanaka, B. T.; Oliveira, I.S.; Taniwaki, M.H. Micotoxinas em alimentos. Academia Pernambucana de Ciência Agronômica. **2010**, 7, 138-161.
- [2] Shibamoto, T.; Bjeldanes, L.F. *Introdução à Toxicologia dos Alimentos*. 2ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2014, 1-328.
- [3] Ismail, N.A.; Mohd, M.H.; Nor, N.M.I.M.; Zakaria, L. Fumonisin B1 producing Fusarium species from agricultural crops in Malaysia. *Crop Prot.* **2017**, 98, 70-75.
- [4] Lazzari, F. A. *Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações*. Editora do Autor: Curitiba, 1997, 1-134.
- [5] Lino, C.M.; Silva, L.J.G.; Pena, A.S., 2004. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. *Rev. Port. Ciênc. Vet.* **2004**, 99(552), 181-192.

- [6] Morgavi, D.P.; Riley, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* **2007**, *137*, 201–212.
- [7] Voss, K.A.; Howard, P.C.; Riley, R.T.; Sharma, R.P.; Bucci, T.J.; Lorentzen, R.J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B1: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). *Cancer Detect Prev.* **2002**, *26*, 1-9.
- [8] Pozzi, C. R.; Arcado, J. R. P.; Junior, I. A.; Fagundes, H., Corrêa, B. Aspectos Relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de Fumonisin. *Cienc Rural.* **2002**, *32*(5), 901-907.
- [9] Enongene, E.N.; Sharma, R.P.; Bhandari, N.; Voss, K.A.; Riley, R.T. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B1. *Food Chem Toxicol.* **2000**, *38*, 793-799.
- [10] Domijan, A.M. Fumonisin B1: a neurotoxic mycotoxin. *Arh Hig Rada Toksikol.* **2012**, *63*, 531-544.
- [11] Johnson, V.J.; Sharma, R.P. Gender-dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B1. *Int Immunopharmacol.* **2001**, *1*, 2023-2034.
- [12] Marin, S.; Ramos, A.J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* **2013**, *60*, 218-237.
- [13] IARC. Mycotoxin control in low- and middle-income countries - edited by Christopher P. Wild, J. David Miller, John D. Groopman. Lyon, France, 2015.
- [14] WHO. Technical Report Series 966. Seventy-fourth of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, Italy, 2011.
- [15] Waskiewicz, A.; Bezsterda, M.; Golinski, P. Occurrence of fumonisins in food - An interdisciplinary approach to the problem. *Food Control.* **2012**, *26*, 491-499.

- [16] IARC. Some tradicional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France, 2002.
- [17] WHO. Technical Report Series 906. Fifty-sixty of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, Switzerland, 2002.
- [18] Voss, K.A.; Riley, R.T.; Norred, W.P.; Bacon, C.W.; Meredith, F.I.; Howard, P.C.; Plattner, R.D.; Collins, T.F.X.; Hansen, D.K.; Porter, J.K. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. Environ. Health Perspect. **2001**, *109*(2), 259-266.
- [19] Turner, P.C.; Nikiema, P.; Wild, C.P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. Mutat Res. **1999**, *443*, 81-93.
- [20] Miller, J.D.; Trenholm, H.L. *Mycotoxins in Grain: compounds other than Aflatoxin*. 2ed. Eagan Press: Minnesota. 1997, 1-552.
- [21] Wang, Z.; Li, S.; Cao, Y.; Tian, X.; Zeng, R.; Liao, D.F.; Cao, D. Oxidative stress and carbonyl lesion in ulcerative colitis and associated colorectal câncer. Oxid Med Cell Longev. **2016**, *2016*, 15.
- [22] Poersh, A.B.; Trombetta, F.; Braga, A.C.M.; Boeira, S.P.; Oliveira, M.S.; Dilkin, P.; Mallmann, C.A.; Figuera, M.R.; Royes, L.F.F.; Oliveira, M.S.; Furian, A.F. Involvement of oxidative stress in subacute toxicity induced by fumonisin B₁ in broiler chicks. Vet Microbiol. **2014**, *174*, 180-185.
- [23] Poersh, A.B.; Trombetta, F.; SouTO, N.S.; Lima, C.O.; Braga, A.C.M.; Dobrachinski, F.; Ribeiro, L.R.; Soares, F.A.A.; Fighera, M.R.; Royes, L.F.F.; Oliveira, M.S.; Furian, A.F. Fumonisin B₁ facilitates seizures induced by pentylenetetrazol in mice. Neurotoxicol. Teratol. **2015**, *51*, 61-67.
- [24] Amira, A.A.; Ashraf, A.K. Ameliorated effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20076 and *Pediococcus acidilactici* NNRL B-5627 on Fumonisin B₁- induced

Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in rats. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2016**, *2*, 326-336.

[25] Domijan, A.M.; Zeljezic, D.; Peraical, M.; Kovacevic, G.; Gregorovic, G.; Krstanac, Z.; Horvatin, K.; Kalafatic, M. Early toxic effects of fumonisin B1 in rat liver. *Hum Exp Toxicol*. **2008**, *27*, 895-900.

[26] Bondy, G.; Suzuki, C.; Barker, M.; Armstrong, C.; Fernie, S.; Hierlihy, L.; Rowsell, P.; Mueller, R. Toxicity of fumonisin B1 administered intraperitoneally to male Sprague–Dawley rats. *Food Chem Toxicol*. **1995**, *33*, 653–665.

[27] Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. **1959**, *82*(1), 70-77.

[28] Ohkawa, H.; Ohishi, N.; Yagi, K. Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Ann. Clin. Biochem*. **1979**, *95*, 351–358.

[29] Jacques-Silva M.C.; Nogueira, C.W.; Broch, L.C.; Flores, E.M.; Rocha, J.B. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol*. **2001**, *88*, 119-125.

[30] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem*. **1996**, *239*(1), 70–76.

[31] Miranda, K.M.; Espey, M.G., Wink, D.A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*. **2001**, *5*, 62-71.

[32] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. **1979**, *72*, 248-254.

[33] Gur, E.; Waner, T. The variability of organ weight background data in rats. *Lab Anim*. **1993**, *27*, 65-72.

[34] Michael, B.; Yano, B.; Sellers, R.S.; Perry, R.; Morton, D.; Roome, N.; Johnson, J.K.; Schafer, K.; Pitsch, S. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies:

a review of regulatory guidelines and a survey of current practices. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 742-750.

[35] Szabó, A.; Szabó-Fodor, J.; Fébel, H.; Romvári, R.; Kovács, M. Individual and combined haematotoxic effects of fumonisin B₁ and T-2 mycotoxins in rabbits. *Food Chem. Toxicol.* **2014**, *72*, 257-264.

[36] Denli, M.; Blandon, J.C.; Salado, S.; Guynot, E.; Casas, J.; Perez, J.F. Efficacy of AdiDetox™ in reducing the toxicity of fumonisin B₁ in rats. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *78*, 60-63.

[37] El-Nekeety, A.A.; El-Kholy, W.; Abbas, N.F.; Ebaid, A.; AMRA, H.A.; ABDEL-WAHHA, M.A. Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats. *Toxicon.* **2007**, *50*, 256-269.

[38] Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.D.; Mazur, M.; Telser, J. Free radical and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **2007**, *39*, 44-84.

[39] Reczek, C.R.; Chandel, N.S. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol.* **2017**, *1*, 79-98.

[40] Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* **2010**, *4*, 118-126.

[41] Hassan, A.M.; Abdel-Aziem, S.H.; El-Nekeety, A.A.; Abdel-Wahhab, M.A. *Panax ginseng* extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub chronically treated with aflatoxin B₁ and fumonisin B₁. *Cytotechnology.* **2015**, *67*, 861-871.

[42] Bernabucci, U.; Covalecchia, L.; Danieli, P.P.; Basiricò, L.; Lacetera, N.; Nardone, A.; Ronchi, B. Aflatoxin B₁ and fumonisin B₁ affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology in vitro.* **2011**, *25*, 684-691.

- [43] Rumora, L.; Domijan, A.M.; Grubisic, T.Z.; Peraica, M. Mycotoxin fumonisin B₁ alters cellular redox balance and signalling pathways in rat liver and kidney. *Toxicology*. **2007**, *242*, 31-38.
- [44] Vasconcelos, S.M.L.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Benfato, M.S.; Manfredini, V.; Kubota, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím. Nova*. **2007**, *30*, 1323-1338.
- [45] Barreiros, A.L.B.S.; David, J.M.; David, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*. **2006**, *29*, 113-123.
- [46] Barbosa, M.R.; Silva, M.M.A.; Willadino, L.; Ulisses, C.; Camara, T.R. Geração e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Cienc Rural*. **2014**, *44*, 453-460.
- [47] Antunes, M.V.; Lazzaretti, C.; Gamaro, G.D.; Linden, R. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após a derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. *Rev Bras Cienc Farm*. **2008**, *44*(2), 279-287.
- [48] Venkataramana, M.; Nayaka, C.; Anand, T.; Rajesh, R.; Aiyaz, M.; Divakara, S.T.; Murali, H.S.; Prakash, H.S.; Rao, P.V.L. Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: The role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. *Food Chem Toxicol*. **2014**, *65*, 335-342.
- [49] Nadja, B.; Laraba-Djebari, F. Beneficial effects of *Androctonus australis* venom and its non-toxic fraction in the restoration of early hepatocyte- carcinogenesis induced by FB₁ mycotoxin: Involvement of oxidative biomarkers. *Exp Mol Pathol*. **2015**, *99*, 198-206.
- [50] Dusse, L.M.S.A.; Vieira, L.M.; Carvalho, M.G. Revisão Óxido Nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab*. **2003**, *39*, 343-350.

- [51] Cerqueira, N.F.; Yoshida, W.B. Óxido Nítrico: revisão. *Acta Cir Bras.* **2002**, *17*, 417-423.
- [52] Fang, Y.Z.; Yang, S.; Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* **2002**, *18*(10), 872-879.
- [53] Reagan-Shaw, S.; Nihal, M.; Ahmad, N. Dose translation from animal to human studies revisited. *The FASEB Journal.* **2007**, *22*(3), 659-661.
- [54] Yazar, S.; Omurtag, G.Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int J Mol Sci.* **2008**, *9*(11), 2062-2090.
- [55] Bhat, R.V.; Shetty, P.H.; Amruth, R.P.; Sudershan, R.V. A foodborne disease outbreak due to the consumption of moldy sorghum and maize containing fumonisin mycotoxins. *Clin Toxicol.* **1997**, *35*(3), 249–255.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on non protein thiols (NPSH) in liver (A), kidney (B) and lung (C) of male mice.

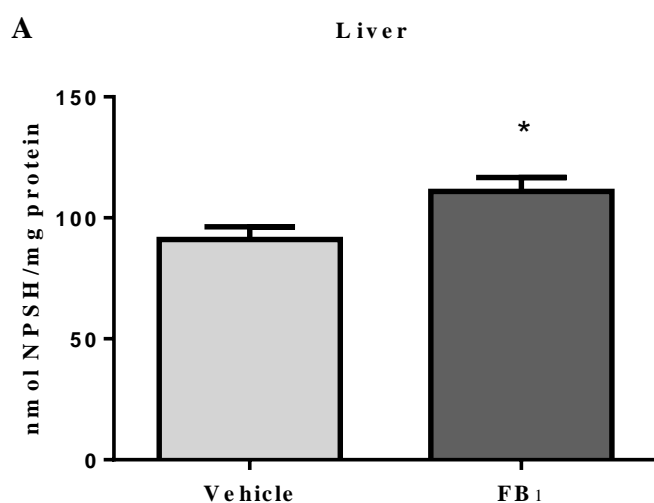


Fig. 1A

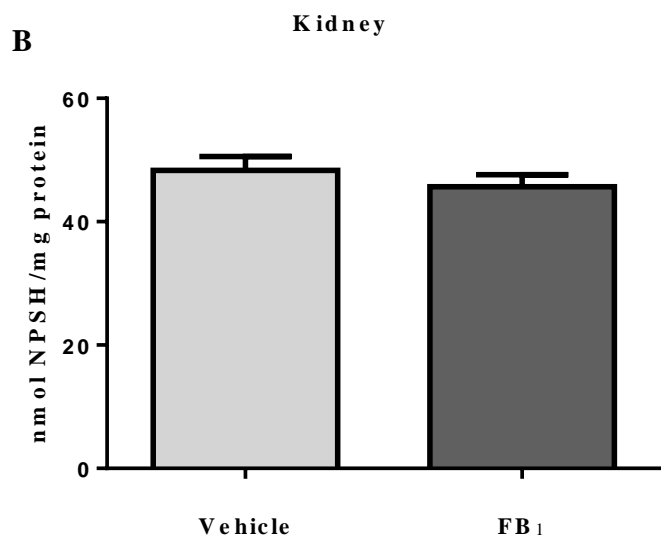


Fig. 1B

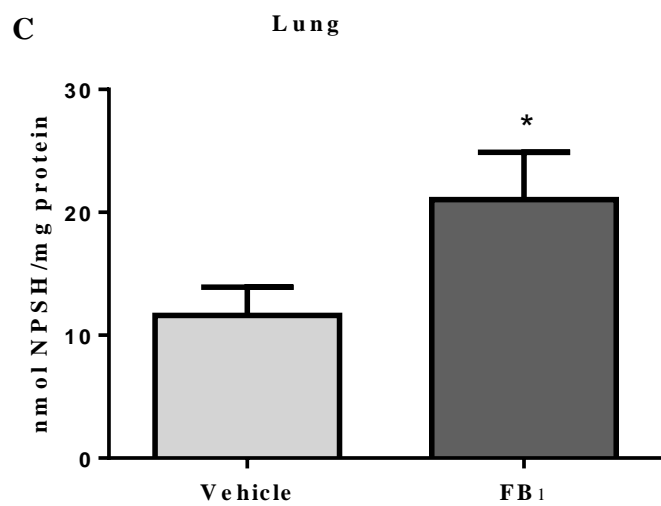


Fig. 1C

Figure 2. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on antioxidant power of iron reduction (FRAP) in liver (A), kidney (B) and lung (C) of male mice.

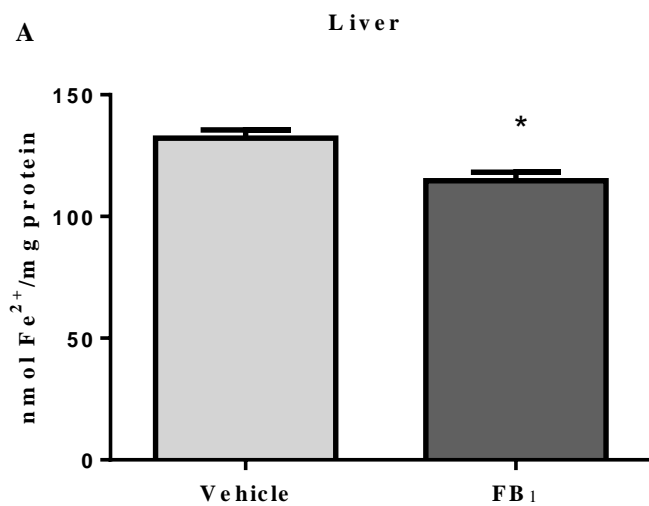


Fig. 2A

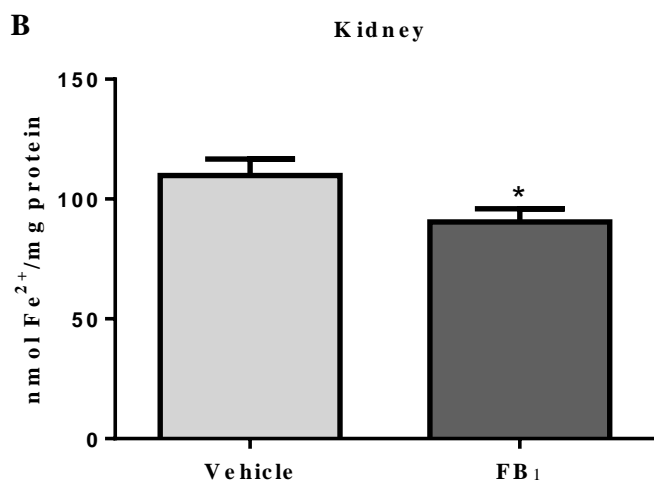


Fig. 2B

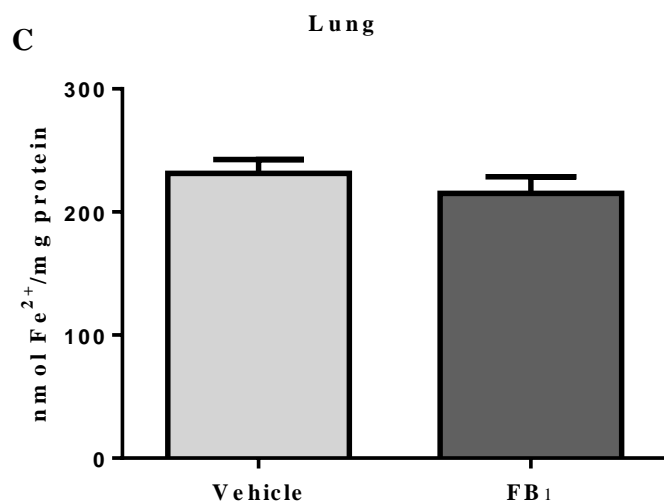


Fig. 2C

Table 1. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on the organ weight of animals.*

	Treatment	
	Vehicle	FB ₁
Adrenal Gland	0,0095 ± 0,0008	0,0078 ± 0,0006
Spleen	0,1181 ± 0,0126	0,0972 ± 0,0098
Brain	0,3168 ± 0,0069	0,3047 ± 0,0078
Heart	0,1634 ± 0,0095	0,1510 ± 0,0059
Epididymis	0,0504 ± 0,0036	0,0450 ± 0,0038
Liver	1,4860 ± 0,0521	1,2350 ± 0,0828
Lung	0,2223 ± 0,0097	0,2433 ± 0,0108
Kidney	0,4204 ± 0,0189	0,3549 ± 0,0158
Testicles	0,1974 ± 0,0079	0,1921 ± 0,0166

* Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

Table 2. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on organ-to-body weight ratio, organ-to-adrenal gland weight ratio and organ-to-brain weight ratio.*

Organs	Organ-to-body weight ratio		Organ-to-adrenal gland weight ratio		Organ-to-brain weight ratio	
	Vehicle	FB ₁	Vehicle	FB ₁	Vehicle	FB ₁
Adrenal Gland	0.0095 ± 0.0008	0.0078 ± 0.0006	-	-	3.003 ± 0.2648	2.561 ± 0.2051
Brain	1.0100 ± 0.0306	1.1050 ± 0.0414	3568 ± 306.5	4121 ± 308.9	-	-
Spleen	0.3774 ± 0.0414	0.3558 ± 0.0405	1280 ± 119.7	1284 ± 122.1	37.88 ± 4.486	32.05 ± 3.153
Heart	0.5213 ± 0.0329	0.5451 ± 0.0217	1842 ± 191.7	2028 ± 140.8	51.76 ± 3.126	49.91 ± 2.492
Epididymis	0.1614 ± 0.0123	0.1633 ± 0.0148	552.7 ± 39.33	612.1 ± 68.00	16.10 ± 1.384	14.72 ± 1.160
Liver	4.709 ± 0.0824	4.4090 ± 0.2045	16928 ± 1766	16590 ± 1501	471.1 ± 19.65	406.9 ± 30.05
Lung	0.9716 ± 0.2754	0.8822 ± 0.0499	3052 ± 508.8	3227 ± 174.9	95.23 ± 25.54	79.87 ± 3.079
Kidney	1.3390 ± 0.0626	1.2770 ± 0.0456	4726 ± 452.3	4792 ± 368.2	133.1 ± 6.369	116.6 ± 4.702
Testicles	0.6296 ± 0.0296	0.6983 ± 0.0677	2221 ± 199.3	2628 ± 320.1	62.91 ± 3.427	62.97 ± 5.288

*Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

Table 3. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on TBARS content in liver, kidney and lung.*

	Treatment	
	Vehicle	FB ₁
Liver	5.32 ± 0.39	5.33 ± 0.66
Kidney	5.08 ± 0.36	4.57 ± 0.27
Lung	10.56 ± 1.01	11.22 ± 1.10

* Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

Table 4. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on ascorbic acid content in liver, kidney and lung.*

	Treatment	
	Vehicle	FB ₁
Liver	6.15 ± 1.17	5.47 ± 1.13
Kidney	6.08 ± 1.06	5.81 ± 1.38
Lung	8.76 ± 1.74	7.79 ± 1.45

*Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

Table 5: Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on NO_x content in liver, kidney and lung.*

	Treatment	
	Vehicle	FB ₁
Liver	0.0049 ± 0.0009	0.0045 ± 0.0010
Kidney	1.1970 ± 0.1783	1.2150 ± 0.3231
Lung	6.1310 ± 1.1890	5.6370 ± 0.9806

*Data are presented as mean ± s.e.m. for 10 animals in each group.

5. ARTIGO 2

Effects of exposure to fumonisin B₁ on behavioral and biochemical parameters in brain of C57BL/6 mice

MICHELI DASSI^a, ANA C. M. BRAGA^b, NAIÉLI S. SOUTO^a,
MAYARA L. FREITAS^b, CLARISSA VASCONCELOS^b, VIVIANE N. ZORZI^c
MAURO S. OLIVEIRA^b, ANA F. FURIAN^{a,b*}

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

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

*^cPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Maria,
97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.*

Abstract

Fumonisin B₁ (FB₁) is the main mycotoxin produced by species of toxigenic fungi belonging to the genus *Fusarium*. This mycotoxin is considered one of the main contaminants of agricultural products and food. Intake of these products is considered the main source of contamination for humans and animals. The damage caused by FB₁ to health involves principally nephrotoxicity and hepatotoxicity. So, the toxic effects of FB₁ on the brain are little studied. In the present study, C57BL/6 male mice received FB₁ (8mg/kg b.w./day) intraperitoneally for four days. At the end of treatment, animals were submitted to behavioral tests (Open Field, Object Recognition, Nest Building and Marble Buryng). After behavioral tests, the brain were removed and cerebral cortex and hippocampus were isolated to determine the content of non-protein thiols (NPSH), antioxidant power of reduced iron (FRAP) and immunoreactivity of the protein kinase C (PKC) in hippocampus. We showed a significant difference between group treated with FB₁ and the vehicle only in the nest building test, with an increased score in the treated group. No changes were observed in the markers of oxidative stress (NPSH and FRAP) in the cortex and hippocampus and in protein kinase C immunoreactivity (PKC-Ser957) in hippocampus.

Key-words: fumonisin B₁, behavioral test, neurotoxicity, nest building

Introduction

Fumonisin B₁ (FB₁) is one of most common mycotoxin produced by toxigenic *Fusarium* under favorable environmental conditions. *Fusarium* species producing FB₁ can infect a wide variety of agricultural crops and consequently, a large number of feeds may be

contaminated.^[1] Among the agricultural products in which FB₁ contaminations are frequently detected is corn and by-products^[2] that are the main source of FB₁ contamination for humans and animals.^[3, 4]

FB₁ is related to variable toxic effects in several animal species, such as nephrotoxic and hepatotoxic effects in rodents,^[5, 6] pulmonary edema, cardiotoxic effects, hepatic syndrome and jaundice in pigs,^[7,8] leukoencephalomalacia and neurotoxic effects in horses and rodents. In addition, studies correlate exposure to FB₁ with development of immunosuppressive processes in poultry, swine, bovine and rodents species.^[9]

In humans, although there is no direct evidence of the effects of fumonisins on health,^[10] several studies report the relationship between fumonisins and damage to the liver, kidneys, neural and cardiovascular defects.^[11] Based on toxicological evidence, fumonisins were classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as a possible carcinogen (Group 2B).^[12]

Although FB₁ has a wide range of biological effects, the brain is undoubtedly a target organ of its toxicity.^[13] Equine leukoencephalomalacia is the main known case of neurotoxicity related to fumonisins, it is a syndrome that mainly affects horses, causing cerebral necrosis with softening of the brain and accumulation of white blood cells.^[14]

Although many studies on the toxicity of FB₁ have been performed, few have evaluated its neurodegenerative potential and the mechanism underlying its neurotoxicity.^[13] Studies conducted by Osuchowski et al. (2005),^[15] with female BALB/c mice, after an intracerebroventricular infusion of FB₁ for a period of 7 days, animals receiving higher dosages developed locomotor problems throughout the treatment, such as unstable gait, tremors and extremity spasticity, it has been observed neurodegeneration in the cortex and activated astrocytes in the hippocampus. So, more studies are necessary to verify if FB₁ could be responsible for alterations in behavior of animals.

In addition, possible alterations in the biogenic amines caused by exposure to FB₁ were investigated using BALB/c mice treated for five days with FB₁ subcutaneously in the cervical region. It has been showed a significant increase in the homovanillic acid/dopamine and 5-hydroxyindolacetic acid/serotonin ratios in various regions of the brain. [16] Additionally, studies suggest the involvement of oxidative stress in the modulation of cognitive processes. [17, 18]

In this context, the objective of the present study was to evaluate the possible behavioral changes caused by exposure to FB₁ in C57BL/6 male mice, as well as biochemical markers of oxidative stress in brain, in order to elucidate the mechanisms that could cause behavioral alterations and/or neurotoxicity.

Materials and methods

Animals

The animals used in the experiment were obtained from the Central Laboratory of the Federal University of Santa Maria-RS (UFSM), and the experimental protocol was approved by the Animal Research Ethics Committee of the University of Santa Maria (CEUA n° 6775010416) and conducted in accordance with national (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA) and international (U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy) legislation.

Twenty male mice C57BL/6J, sixty days old and weighing between 20 and 30g, were used. Animals were maintained in polypropylene boxes of 41 x 34 x 16 cm under controlled light conditions - light/dark cycle of 12 hours and temperature (22 ± 2 °C).

Mycotoxin and reagents

Analytical standards of mycotoxin and reagents for determination of oxidative stress indicators were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) or Cayman Chemical (Michigan, USA). Primary antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Western blot reagents were obtained from Bio-Rad (Hercules, CA USA) or Pierce (Rockford, IL, USA). All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich or equivalent quality.

Experimental design and sampling

The animals were divided into two groups of ten animals each. For the first group (vehicle group), a solution containing saline (0.9% NaCl) plus DMSO (1.6%) was administered intraperitoneally (10 mL/kg) and for the second group (treated group) fumonisin B₁ (8 mg/kg) intraperitoneally (10 mL/kg). Both groups were treated for four days, receiving a daily dose of the vehicle or treatment.

After four days of vehicle administration or FB₁, one hour after administration of the last dose, the animals were evaluated in behavioral and cognitive tests through open field tests, object recognition, nest building test and marble burying test. After the tests were performed, animals were euthanized, brain is removed, cerebral cortex and hippocampus were dissected, weighed and homogenized for biochemical analysis.

Behavioral Tests

Open-field Test

For the evaluation of exploratory locomotor activity and general activity levels of the animals, the open field test was used. The apparatus used for the test consists of a circular space closed at the ends and open at the top, whose floor is 56 cm in diameter divided into ten equal areas. Five of these areas had their boundaries delimited by the wall of the field being considered the peripheral regions and the others considered central regions. Each animal was placed individually in the center of the apparatus and observed for 10 min to record the locomotor activity (number of crosses with all four legs) and exploratory activity (expressed by the number of lifting responses, that is, standing on the hind legs). It was also evaluated the length of stay in central or peripheral areas, number of feces and time of cleaning.^[19]

Object Recognition Test

The object recognition test consists of analyzing the animals natural ability to recognize a new object in an environment that has been previously presented. The test consists of three sessions: training (first session), short term memory evaluation (second session, 4 h after training) and long term memory evaluation (third session, 24 h after training). In the training the animal was presented to two identical objects (cup - cup) and during ten minutes the time by the animal exploring these objects is registered. After 4 h, one of the objects was replaced by a new object (cup - plastic apple) and for 10 min the time spent by the animal exploring the old object and the new one was registered. After 24 h, again one of the objects was replaced by a new object (glass - bottle) and for 10 min the time spent by

the animal explored each of the objects was registered. The data collected 4 or 24 h after the training were used as measures of short and long term memory, respectively. The object recognition index was calculated with the following formula: Recognition index = (time spent on the new object) / (time spent on the new object + time spent on the object already known). [20]

Marble Burying Test

To perform the test, an opaque plain plastic box was used, measuring approximately 26 x 16cm and having a 5cm high layer of sawdust inside. Twelve glass balls of approximately 15mm in diameter were arranged on the sawdust, separated 4cm apart, forming 6 rows and 2 columns. The animals were placed individually in the boxes and after 30 min the animal was removed from the test site and the number of glass beads that were fully buried or with more than 75% of the object body covered by sawdust were counted. The level of anxiety of the animal is evaluated according to the number of buried glass balls, and the more glass balls are buried, the higher the level of anxiety can be considered. [21]

Nest Build Test

The nest building test consists of evaluating the loss or reduction of the animals ability to perform normal daily tasks, correlating changes with the possible development of anxiety and depression. The animals were individually arranged in opaque and smooth boxes (26 x 16cm) containing a square of compact cotton, measuring approximately 5cm and 3g. The test started about one hour before the dark phase, and its results were evaluated one hour after the start of the clear phase of the cycle. The nest construction was evaluated by a 5-point scale,

where 1 corresponds to a nearly intact nest (> 90% intact); 2 corresponds to the partially torn nest (50-90% remain intact); 3, to the ripped and scattered cotton, without identifiable nest organization (<50% intact); 4, the identification of a nest, but this is flat, with walls smaller than 50% of the circumference of the body of the mouse (> 90% torn); And 5 corresponds to the identification of a practically perfect nest, with more than 90% of the cotton torn and the walls larger than 50% of the circumference of the mouse body. ^[22]

Biochemical Analysis

Non-protein thiol (NPSH) determination

For the determination of the non-protein thiol content, a methodology developed by Ellman (1959) ^[23] was used. This methodology is based on the reaction between 5,5'-dithio-bis- (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and the thiol groups present in the sample, resulting in a yellow-colored compound (2-nitro-5-mercapto-benzoic acid-TBN) which is measured in a spectrophotometer at the wavelength of 412 nm. The results were expressed as nmol NPSH/mg protein, based on a standard curve constructed with cysteine and corrected for the protein content of the sample.

Antioxidant power of iron reduction (FRAP) determination

To determine the antioxidant power of the samples, a methodology described by Benzie and Strain (1996) ^[24] was used. This methodology is based on the ability of the antioxidants present in the sample to reduce Fe^{3+} to Fe^{2+} , in the presence of 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) and acid medium, resulting in the formation of a complex (Fe^{2+} -TPTZ) of

intense blue coloration which is measured in a spectrophotometer at a wavelength of 593 nm.

The results were expressed as nmol Fe²⁺/mg protein.

Protein determination

Quantification of the protein content present in the samples was performed using a methodology described by Bradford (1976) [25] and the values obtained were used to correct the NPSH and FRAP tests.

Western blot analysis

Western blot analysis was carried out, as described previously Casu et al. (2007) [26] with minor modifications. The hippocampus was removed, dissected homogenized on ice in tissue protein extraction reagent T-PER (Thermo Scientific) supplemented with HaltTM protease and phosphatase inhibitors Cocktail (100x) (Thermo Scientific). Homogenized samples were then centrifuged at 10,000g at 4 °C for 5 min and supernatant kept for further manipulation.

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

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

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

Statistical analysis

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

Results and discussion

FB₁ is considered, among the group of fumonisins, the one of greater occurrence and toxicity.^[7] Among the various damages caused by exposure to this mycotoxin, damage related to the central nervous system has been increasingly studied. Tsunoda et al. (1998)^[16] observed changes in biogenic amine concentrations following administration of FB₁ (0, 0.25, 0.75, 2.25 and 6.75 mg/kg/day b.w.) subcutaneously in the cervical region of BALB mice/c for five days. Knowing that changes in biogenic amines are directly related to the development of anxiety and depression,^[27] it is observed the participation in FB₁ in the predisposition of these pathologies, so it is important to verify behavioral changes after exposure to FB₁.

In addition, studies suggest that changes in the metabolism of sphingolipids, one of the possible explanations for the toxicity of FB₁, may be related to the development of anxiety and depression, since they play important roles in the signaling and internalization of neurotransmitters.^[28]

Thus, in the present study, the possible changes caused by exposure to FB₁ (8 mg/kg) in behavioral parameters, as well as possible biochemical changes in the cortex and hippocampus of mice after four days of treatment were evaluated.

In the open field test, no significant changes were observed (crossing number, rearing number, time spent in the center (%) and latency to explore) in animals treated with FB₁ compared to vehicle group [t(18) = 1.203, P= 0.2446; t(18) = 0.1038, P= 0.9185; t(18)= 1.046, P=0.3094; t(18)= 1.290, P= 0.2134, Table 1]. In addition, no significant changes were observed in the object recognition index evaluated 4 h after the training [t(18) = 1.437, P= 0.1679, Table 2] (parameter related to short-term memory) and in the recognition index evaluated 24 h after the training [t(18) = 0.074, P= 0.9417, Table 2] (related to long-term memory). The results show that FB₁ does not cause changes in the locomotor and exploratory activity of the animals, nor does it cause memory damage, since no significant difference was observed between the group treated with FB₁ and the vehicle in the open field tests and recognition of objects.

In addition, we evaluate whether FB₁ would affect the anxiety of the animals. We did not observe changes in the marble burying test [t(18)= 0.1127, 0.9115, Table 3], however in the nest building test, a significant increase of the nesting score in the group treated with FB₁ was observed when compared to vehicle group [t(18)= 2.384, P= 0.0283, Table 3].

The nest building test is considered a specific form of active interaction with the environment for shelter and temperature control.^[29] In addition, building nests can serve as protection against predators by hiding or camouflaging the mouse.^[30] According to Deacon

(2006b),^[30] nesting behavior may be impaired by hippocampal lesions, but it is not influenced by lesions in the cerebral cortex. Still, according to the author, nesting behavior can be determined by a number of factors, especially hormonal sensitivity. So, FB₁ could induce a hippocampal lesion that reflect the major score in the nest test.

In addition, sphingolipid degradation products following exposure to FB₁ are potent modulators of protein kinase C (PKC) activity, which represents a family of more than 12 phospholipid-dependent serine/threonine kinases, which modulate various biological responses.^[31] The higher expression levels of PKC are found in the brain, especially in the hippocampus and related structures.^[32] In this sense, the immunoreactivity of PKC in the hippocampus was determined in order to identify any possible alterations that could justify the results obtained in the nest test, which demonstrated the increase in the anxiety levels of the animals treated with FB₁. However, no significant differences were observed between the vehicle and treated groups in the hippocampal PKC immunoreactivity [$t(6) = 0.5402$, $P = 0.6085$, Fig. 1].

Several neurotransmitters participate to a greater or lesser degree in the development of anxiety disorders, such as biogenic amines (noradrenaline, serotonin and dopamine).^[33] According to Paila, Ganguly & Chattopadhyay (2010),^[34] the metabolic depletion of sphingolipids caused by FB₁ is able to impair the function of brain serotonin receptors (5-HT_{1A}), which act extremely important in the generation and modulation of numerous cognitive functions, behavioral and developmental, among them humor, depression, anxiety and learning. Thus, the administration of FB₁ could predispose the development of behavioral changes by altering the metabolism of sphingolipids and consequently of neurotransmitters. Future studies may be to look for the relationship between behavioral changes and quantification of the biogenic and neurotransmitters to elucidate the mechanism of FB₁.

Another point that has frequently been highlighted as a predisposing factor of several affective and behavioral disorders is the development of oxidative stress. According to Balmus et al. (2016),^[35] oxidative damage has been very frequently present in several affective disorders, which may be related to a greater vulnerability of the central nervous system to such damages.

In addition, several studies in the literature show the FB₁-induced oxidative changes in various protocols, species and organs, suggesting a possible mechanism of action for mycotoxin. As an example, we can mention the study carried out by Hassan et al. (2010),^[36] which showed an increase in hepatic levels of malondialdehyde, decreased glutathione and total antioxidant capacity after treatment of Sprague-Dawley females with diet contaminated with FB₁ (200 mg/kg diet) for 4 weeks, as well as a study by Amira and Ashraf (2016)^[37] in which male Sprague Dawley rats were treated with FB₁ (50, 100 and 200 mg/kg in the diet) for 4 weeks, with increased levels of malondialdehyde, nitric oxide and oxidation state total, accompanied by decreased glutathione levels, SOD activity and total antioxidant capacity in liver and kidney samples at all concentrations tested. Furthermore, Poersh et al. (2014),^[38] after treating young chickens for 21 days on a diet contaminated with FB₁ (100 mg/kg) observed an increase in the levels of TBARS, vitamin C and CAT activity, with no change in SOD, GST and hepatic NPSH levels.

In the oxidative damage markers performed in this study, statistical analyzes showed that there was no significant difference in NPSH content in the cerebral cortex and hippocampus between the treated and vehicle groups [t (18)=1.408, P= 0.1761; t(18) = 0.7582, P=0.4581, Table 4]. There were also no significant difference in the test for the determination of antioxidant power by the reduction of iron between the groups for the cerebral cortex [t(18)=0.2869, P=0.7772, Table 4] and hippocampus [t(18) = 0.7941, P= 0.4375, Table 4], after exposure to FB₁ for 4 days.

So, a possible justification for elevated score in the nesting test representing an increased anxiety of treated animals, would be that FB₁ induced changes in brain receptors, unrelated to oxidative stress or activation of protein kinase C.

In view of the results found in the present study, it can be concluded that the administration of FB₁ may predispose changes in parameters related to the anxiety of the treated animals, but more studies are needed to elucidate the mechanism by which FB₁ leads to such changes.

Acknowledgements

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS grant #16/2551-0000365-3) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq grant #471653/2013-6). M.D., M.S.O., and A.F.F. (grant #304824/2016-0) are the recipients of CNPq fellowships; A.C.M.B., M.L.F and N.S.S. are the recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships. Authors thank Dr Carlos Fernando de Mello and Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction (BioRep) for providing laboratory facilities.

References

- [1] Ismail, N.A.; Mohd, M.H.; Nor, N.M.I.M.; Zakaria, L. Fumonisin B1 producing *Fusarium* species from agricultural crops in Malaysia. *Crop Protection*, **2017**, *98*, 70-75.
- [2] WHO. Technical Report Series 906. Fifty-sixty of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva, Switzerland. **2002**.

- [3] Voss, K.A.; Riley, R.T.; Norred, W.P.; Bacon, C.W.; Meredith, F.I.; Howard, P.C.; Plattner, R.D.; Collins, T.F.X.; Hansen, D.K.; Porter, J.K. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. *Environ Health Perspect*, **2001**, *109*, 259-266.
- [4] Iamanaka, B. T.; Oliveira, I.S.; Taniwaki, M.H. Micotoxinas em alimentos. *Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, **2010**, *7*, 138-161.
- [5] Voss, K.A.; Howard, P.C.; Riley, R.T.; Sharma, R.P.; Bucci, T.J.; Lorentzen, R.J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B₁: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). *Cancer Detect Prev*, **2002**, *26*, 1-9.
- [6] Enongene, E.N.; Sharma, R.P.; Bhandari, N.; Voss, K.A.; Riley, R.T. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B₁. *Food Chem. Toxicol*, **2000**, *38* (9), 793-799.
- [7] Pozzi, C. R.; Arcado, J. R. P.; Junior, I. A.; Fagundes, H., Corrêa, B. Aspectos Relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de Fumonisinas. *Cienc Rural*, **2002**, *32* (5), 901-907.
- [8] Morgavi, D.P.; Riley, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. *Anim. Feed Sci. Technol*, **2007**, *137*, 201–212.
- [9] Johnson, V.J.; Sharma, R.P. Gender-dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B₁. *Int Immunopharmacol*, **2001**, *1*(11), 2023-2034.
- [10] Marin, S.; Ramos, A.J.; Cano-Sancho, G.; Sanchis, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol*, **2013**, *60*, 218-237.
- [11] Waskiewicz, A.; Bezsterda, M.; Golinski, P. Occurrence of fumonisins in food - An interdisciplinary approach to the problem. *Food Control*, **2012**, *26*, 491-499.

- [12] IARC. Some tradicional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France. **2002**.
- [13] Domijan, A.M. Fumonisin B₁: a neurotoxic mycotoxin. *Arh Hig Rada Toksikol*, **2012**, *63*, 531-544.
- [14] Shibamoto, T.; Bjeldanes, L.F. *Introdução à Toxicologia dos Alimentos*. 2ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2014.
- [15] Osuchowski, M.F.; Edwards, G.L.; Sharma, R.P. Fumonisin B₁ – induced neurodegeneration in mice after intracerebroventricular infusion is concurrent with disruption of sphingolipid metabolism and activation of proinflammatory signaling. *Neurotoxicology*, **2005**, *26*, 211-221.
- [16] Tsunoda, M.; Dugyala, R.R.; Sharma, R.P. Fumonisin B₁ induced increases in neurotransmitter metabolite levels in different brain regions of BALB/c mice. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **1998**, *120* (3), 457-465.
- [17] Abidin, I.; Yargıçoglu, P.; Agar, A.; Gümüşlu, S.; Aydın, S.; Ozturk, O.; Sahin, E. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. *Int J Neurosci*, **2004**, *114* (5), 683-699.
- [18] Silva, R.H.; Abilio, V.C.; Takatsu, A.L.; Kameda, S.R.; Grassl, C.; Chehin, A.B.; Medrano, W.A.; Calzavara, M.B.; Registro, S.; Andersen, M.L.; Machado, R.B.; Carvalho, R.C.; Ribeiro, R.A.; Tufki, S.; Frussa-Filho, R. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology*, **2004**, *46*, 895-903.
- [19] Kerr, D.S.; Bevilacqua, L.R.; Bonini, J.S.; Rossato, J.I.; Kohler, C.A.; Medina, J.H.; Izquierdo, I.; Cammarota, M. Angiotensin II blocks memory consolidation through an AT₂ receptor-dependent mechanism. *Psychopharmacology*, **2005**, *179*, 529-535.

- [20] Ennaceur, A.; Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. I: Behavioral data. *Behav Brain Res*, **1988**, *31*, 47-59.
- [21] Deacon, R.M.J. Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nat Protoc*, **2006a**, *1* (1), 122-124.
- [22] Deacon, R. Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp*, **2012**, *5*(59), 1-12.
- [23] Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, **1959**, *82* (1), 70-77.
- [24] Benzie, I. F. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal Biochem*, **1996**, *239* (1), 70-76.
- [25] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **1976**, *72*, 248-254.
- [26] Casu, M. A.; Sana, A.; Spada, G.P.; Falzoi, M.; Mongeau, R.; Pani, L. Effects of acute and chronic valproate treatments on p-CREB levels in the rat amygdala and nucleus accumbens. *Brain Res*, **2007**, *1141*, 15-24.
- [27] Bahls, S.C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. *Interação*, **1999**, *3*, 49-60.
- [28] Müller, C.P.; Reichel, M.; Mühle, C.; Rheina, C.; Gulbins, E.; Kornhuber, J. Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. *Biochim Biophys Acta*, **2015**, *1851*, 1052-1065.
- [29] Filali, M.; Lalond, R. Age-related cognitive decline and nesting behavior in an APP^{swe}/PS1 bigenic model of Alzheimer's disease. *Brain. Res*, **2009**, *1292*, 93-99.
- [30] Deacon, R.M.J. Assessing nest building in mice. *Nat Protoc*, **2006b**, *1* (3), 1117-1119.

- [31] Lee, J.Y.; Hannun, Y.A.; Obeid, L.M. Functional dichotomy of protein kinase C (PKC) in tumor necrosis factor- α (TNF- α) signal transduction in L929 cells. Translocation and inactivation of PKC by TNF- α . *J. Biol. Chem*, **2000**, *275*, 292890-29298.
- [32] Naderi, R.; Esmaeili-Mahani, S.; Abbasnejad, M. Phosphatidylinositol-3-kinase and protein kinase C are involved in the procognitive and anti-anxiety effects of phytohormone abscisic acid in rats. *Biomed. Pharmacother*, **2017**, *96*, 112-119.
- [33] Braga, J.E.F.; Pordeus, L.C.; Da Silva, A.T.M.C.; Pimenta, F.C.F.; Diniz, M.F.F.M.; De Almeida, R.N. Ansiedade Patológica: bases neurais e avanços na abordagem psicofarmacológica. *R Bras Ci Saúde*, **2010**, *14* (2), 93-100.
- [34] Paila, Y.D.; Ganguly, S.; Chattopadhyay, A. Metabolic Depletion of Sphingolipids Impairs Ligand Binding and Signaling of Human Serotonin 1_A Receptors. *Biochemistry*, **2010**, *49*, 2389-2397.
- [35] Balmus, I.M.; Ciobica, A.; Antioch, I.; Dobrin, R.; Timofte, D. Oxidative Stress Implications in the Affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. *Oxid Med Cell Longev*, **2016**, *2016*, 1-25.
- [36] Hassan, A.M.; Mohamed, S.R.; El-Nekeety, A.A.; Hassan, N.S.; Abdel-Wahhab, M.A. *Aquilegia vulgaris* L. extract counteracts oxidative stress and cytotoxicity of fumonisin in rats. *Toxicon*, **2010**, *56*, 8-18.
- [37] Amira, A.A.; Ashraf, A.K. Ameliorated effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20076 and *Pediococcus acidilactici* NNRL B-5627 on Fumonisin B1- induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in rats. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2016**, *2*, 326-336.
- [38] Poersh, A.B.; Trombetta, F.; Braga, A.C.M.; Boeira, S.P.; Oliveira, M.S.; Dilkin, P.; Mallmann, C.A.; Figuera, M.R.; Royes, L.F.F.; Oliveira, M.S.; Furian, A.F. Involvement of

oxidative stress in subacute toxicity induced by fumonisin B₁ in broiler chicks. *Vet Microbiol*, 2014, 174, 180-185.

FIGURE CAPTION

Figure 1. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg i.p.) on the levels of p-PKC α Ser957 /PKC α subunit ratio in hippocampus of male mice C57BL/6. Data are presented as Mean \pm S.E.M. for 6 animals in each group.

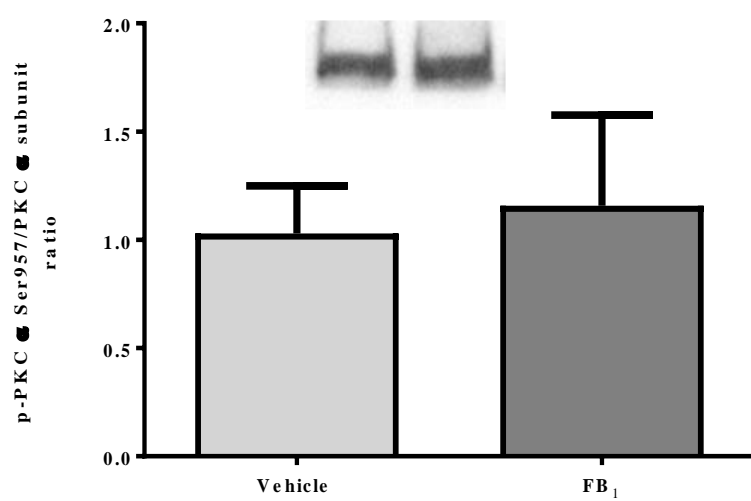


Fig. 1

Table 1. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on open field test.

	Treatment	
	Vehicle	FB ₁
Time spent in center (%)	8.41 ± 3.83	4.21 ± 1.20
Latency to exploration (s)	1.60 ± 0.22	2.30 ± 0.50
Crossing number	57.50 ± 12.29	37.50 ± 11.20
Rearing number	16.60 ± 3.77	16.00 ± 4.38
Faeces number	2.30 ± 0.70	3.50 ± 0.52
Cleaning time (s)	16.50 ± 4.72	34.50 ± 10.37

* Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

Table 2. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on object recognition test. *

	4 hours		24 hours	
	Vehicle	FB ₁	Vehicle	FB ₁
5 minutes	0.85 ± 0.061	0.79 ± 0.08	0.80 ± 0.10	0.63 ± 0.08
10 minutes	0.72 ± 0.06	0.81 ± 0.03	0.68 ± 0.06	0.69 ± 0.05

* Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

Table 3. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on nest test and marble burying test. *

	Treatment	
	Vehicle	FB ₁
Nest Test (score)	2.40 ± 0.34	3.60 ± 0.37 [#]
Buried Balls (number)	7.00 ± 1.16	7.20 ± 1.35

*Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group. #Indicates a significant difference compared to vehicle group.

Table 4. Effect of fumonisin B₁ (8 mg/kg/i.p.) on NPSH (nmol NPSH/mg protein) and FRAP (nmol Fe⁺/mg Protein) content in cerebral cortex and hippocampus. *

	NPSH		FRAP	
	Vehicle	FB ₁	Vehicle	FB ₁
Cerebral Córtext	28.27 ± 0.84	30.34 ± 1.20	67.96 ± 7.09	70.90 ± 7.42
Hippocampus	16.16 ± 1.29	17.40 ± 0.99	175.4 ± 13.43	200.0 ± 27.91

*Data are presented as Mean ± S.E.M. for 10 animals in each group.

6. DISCUSSÃO

Dentre os alimentos tradicionalmente mais consumidos pela população destacam-se os cereais, que assim como outras commodities agrícolas estão sujeitos a contaminações pelos mais variados agentes tóxicos, dentre os quais destacam-se as micotoxinas (ANDRADE, 2016).

A ocorrência de micotoxinas em alimentos e derivados é considerada um problema mundial, atingindo tanto países em desenvolvimento quanto países desenvolvidos. A contaminação dos alimentos pelas micotoxinas resulta em enormes prejuízos econômicos em toda a cadeia produtiva, visto que podem reduzir a produção agrícola e animal, interferindo ou até mesmo impedindo exportações de alimentos. Além disso, os prejuízos causados pelas contaminações por micotoxinas atingem também o setor da saúde pública, especialmente nos países em desenvolvimento, onde os alimentos de qualidade superior são destinados à exportação e os de menor qualidade, ou seja, com níveis mais altos de micotoxinas acabam permanecendo no país, sendo vendidos e consumidos no mercado interno (CRUZ, 2010).

O acúmulo de micotoxinas em alimentos é considerado uma ameaça à saúde humana e animal, uma vez que estas são a causa de diversas intoxicações, indução de câncer, mutagenicidade, distúrbios gastrointestinais, vasculares, renais e neurológicos e também, em alguns casos, redução da resistência a doenças infecciosas atuando como imunossupressoras (FAO, 2017).

As fumonisinas, em especial a FB₁, destacam-se como um dos principais grupos de micotoxinas que acarretam danos à saúde humana e animal. Segundo Cruz (2010), a incidência de fumonisinas é verificada mundialmente em alimentos destinados à alimentação humana e animal, em especial no milho, sendo que estudos demonstram que *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*), uma das principais espécies de fungos relacionadas com a produção de FB₁ é encontrada em cerca de 90% das amostras deste cereal.

A FB₁ foi classificada pela IARC como um possível cancerígeno para humanos (Grupo 2B), ou seja, existem evidências limitadas de uma associação desta micotoxina com o desenvolvimento de câncer em seres humanos (IARC, 2002). Além disso, o caráter carcinogênico das fumonisinas não envolve uma interação direta com o DNA e desta forma, diversos estudos vêm buscando elucidar a forma pela qual a FB₁ desenvolve seus mecanismos de toxicidade.

A principal teoria utilizada para explicar a ação tóxica da FB₁ é a de que ela atua causando alteração no metabolismo dos esfingolipídios. Pela semelhança existente entre a molécula da fumonisina e a das bases esfingóides (esfingosina e esfinganina), que servem de substrato para a enzima ceramida sintase sintetizar os esfingolipídios, as fumosinas podem se ligar a esta enzima inibindo a síntese de esfingolipídios e fazendo com que ocorra um acúmulo de esfingosina e esfinganina no soro, consistindo no mecanismo primário de toxicidade destas micotoxinas (LINO, SILVA & PENA, 2004).

A alteração do metabolismo dos esfingolipídios, com inibição da síntese dos mesmos, é relacionada com diversos danos nos processos nos quais estes compostos estão envolvidos, tais como composição da membrana celular, comunicação intercelular, interação intracelular, entre outros, o que pode relacionar-se de tanto com o desenvolvimento de carcinogenicidade quanto de outros efeitos tóxicos (MILLER & TRENHOLM, 1997).

Outro ponto que vem sendo alvo de interesse cada vez maior no estudo dos mecanismos de toxicidade da FB₁ é o envolvimento da mesma no desenvolvimento de quadros de estresse oxidativo. Estudos demonstram que a FB₁ é capaz de induzir a formação de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, demonstrando que a mesma é capaz de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio que podem levar a danos ao DNA. A 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina é uma das formas predominantes de lesões oxidativas induzidas por radicais livres no DNA nuclear e mitocondrial (IARC, 2002). Esta se forma pela interação de radicais livres, em especial radical hidroxil (HO[•]), com as bases nucleotídicas do DNA, tais como a guanina e tem sido amplamente utilizado como biomarcador de dano oxidativo endógeno ao DNA e como fator de iniciação e promoção de carcinogênese (VALAVANIDIS; VLACHOGIANNI & FIOTAKIS, 2009).

Os quadros de estresse oxidativo também podem ser relacionados com danos ao sistema nervoso central, sendo observada uma correlação entre os danos oxidativos e o desenvolvimento de transtornos afetivos (BALMUS et al., 2016). Além disso, as alterações no metabolismo dos esfingolipídios também podem ser correlacionadas com o desenvolvimento de quadros de ansiedade e depressão, uma vez que os mesmos desempenham papéis importantes na sinalização e internalização de neurotransmissores (MÜLLER et al., 2015).

Desta forma, este trabalho buscou investigar as possíveis alterações causadas em marcadores de estresse oxidativo e parâmetros comportamentais após a administração de FB₁ (8 mg/kg i.p.) durante quatro dias a camundongos C57BL/6.

Os resultados obtidos demonstram que as alterações causadas pela FB₁ nas condições do protocolo testado, são variadas de acordo com os órgãos analisados. Observou-se um aumento significativo no teor de NPSH no fígado e pulmão, sem alterações renais significativas. Já, para a análise do poder antioxidante total pelo método do FRAP, observou-se uma diminuição significativa em fígado e rim para os animais tratados, sem alteração a nível pulmonar.

Segundo Rumora et al. (2007), o fígado e pulmão seriam os principais locais de síntese de GSH, principal representante do grupo dos tióis não-proteicos. Desta forma, sugere-se pelos resultados encontrados, que a exposição à FB₁ estimulou uma maior síntese destes compostos agindo como um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo induzido pela mesma nestes dois órgãos. Além disso, os resultados obtidos para o FRAP estão de acordo com os anteriores, uma vez que, no tecido hepático, houve uma redução na capacidade de defesa antioxidante total, mesmo com o aumento do teor de NPSH, o que pode ser explicado pelo fato de que este método se baseia na capacidade dos antioxidantes presentes no organismo de reduzir o Fe³⁺, sendo a GSH é um exemplo de antioxidante que não apresenta tal capacidade (VASCONCELOS et al., 2007).

Os níveis de ácido ascórbico, que também atua como antioxidante no organismo, não mostraram variação significativa para nenhum dos órgãos testados. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a GSH participa do metabolismo do ácido ascórbico, colaborando para a formação de ascorbato (forma ativa do ácido ascórbico no organismo) (BARBOSA et al., 2014), e como observou-se um aumento significativo nas concentrações de GSH, a manutenção das concentrações normais de ascorbato seria possível.

Na análise da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) não foi observada variação entre os grupos tratado e controle para nenhum dos órgãos analisados. Segundo Venkataramana et al. (2014), o MDA pode ser considerado um marcador tardio de estresse oxidativo, desta forma, para que fosse observada a formação das espécies reativas seria necessário um período de tratamento maior do que o de quatro dias utilizado no presente estudo.

Outro parâmetro importante na avaliação de quadros de estresse oxidativo é a determinação do óxido nítrico indireto (NOx), pelo qual pode-se avaliar a formação de espécies reativas no organismo. No presente estudo, a determinação do óxido nítrico indireto não demonstrou alteração significativa em nenhum dos órgãos testados. Uma vez que o NO

apresenta uma alta capacidade de se ligar a grupos formadores de tiol (nitrosotiol), os níveis elevados de NPSH observados justificariam o resultado encontrado.

Quanto aos testes comportamentais realizados, não foram observadas alterações em parâmetros relacionados ao comportamento locomotor e nem em parâmetros relacionados à memória. No entanto, foi observado um aumento no nível de ansiedade dos animais tratados com FB₁ em relação aos animais controle, representado pelo aumento no escore de nidificação no teste de construção de ninho.

Segundo Deacon (2006), o comportamento de nidificação pode ser prejudicado por lesões no hipocampo, mas não sofre influência por lesões no córtex cerebral e também pode ser determinado por uma série de outros fatores, em especial a sensibilidade hormonal.

Uma vez que não foram observadas alterações em marcadores de estresse oxidativo a nível cerebral e sabendo-se que os produtos de degradação de esfingolipídios após a exposição à FB₁ são moduladores potentes da atividade da proteína quinase C (PKC) e que a mesma modula diversas atividades biológicas (LEE & HANNUN, 2000), determinou-se a imunoreatividade da mesma de modo a investigar uma possível correlação entre alterações na mesma e a alteração comportamental observada nos animais tratados. No entanto, nenhuma alteração significativa na imunoreatividade da proteína quinase C foi observada nos animais tratados em relação ao controle.

Estudos sugerem que a depleção metabólica dos esfingolipídios causada pela FB₁ é capaz de prejudicar a função de receptores cerebrais de serotonina (5-HT_{1A}) que atuam de forma extremamente importante na geração e modulação de inúmeras funções cognitivas, comportamentais e de desenvolvimento, dentre elas humor, depressão, ansiedade e aprendizagem (PAILA, GANGULY & CHATTOPADHYAY, 2010). Visto que vários neurotransmissores participam em maior ou menor grau no desenvolvimento dos transtornos da ansiedade, destacando-se dentre eles as aminas biogênicas (noradrenalina, serotonina e dopamina) (BRAGA et al., 2010), a administração de FB₁ poderia predispor o desenvolvimento de alterações comportamentais através da alteração do metabolismo dos esfingolipídios e conseqüentemente de neurotransmissores.

Frente aos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que a administração de FB₁ (8 mg/kg) durante um período de 4 dias, é capaz de induzir alterações em marcadores de estresse oxidativo em órgãos periféricos de forma diferente de acordo com o órgão analisado e nenhuma alteração em marcadores de estresse oxidativo a nível cerebral foi observada em camundongos. Demonstrou-se também, que na dose e tempo empregados no

presente estudo, a nível comportamental, a única alteração observada foi relacionada ao aumento da ansiedade dos animais tratados em relação aos controle no teste de construção de ninho, sem relação com marcadores de estresse oxidativo ou imunoreatividade da proteína quinase C. Desta forma, uma hipótese proposta pode ser a relação de possíveis alterações causadas pela FB₁ no metabolismo dos esfingolipídios e conseqüentemente na função de neurotransmissores cerebrais que se relacionam ao comportamento dos animais.

7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pode-se concluir que:

Artigo 1:

- Após a exposição à quatro doses de FB₁ não houveram alterações no peso corporal dos animais, peso total dos órgãos ou peso relativo.
- A exposição à FB₁ aumentou significativamente os níveis de NPSH em fígado e pulmão, sem nenhuma alteração a nível renal.
- A exposição à FB₁ causou uma diminuição significativa do FRAP em fígado e rim, sem nenhuma alteração a nível pulmonar.
- Os níveis de TBARS, NO_x e Ácido Ascórbico não foram alterados pela exposição à FB₁ em nenhum dos órgãos analisados.

Artigo 2:

- A FB₁ não alterou o comportamento motor e exploratório dos animais através dos parâmetros avaliados no teste de campo aberto.
- No teste de construção de ninho observou-se um aumento significativo no escore após a exposição à FB₁.
- Não foi observada diferença significativa no número de bolinhas enterradas entre os grupos no teste de marble burying.
- A FB₁ não interferiu na capacidade de aprendizado e memória dos animais avaliados no teste de reconhecimento de objetos.
- Não foi observada alteração no conteúdo de NPSH e FRAP analisados no córtex cerebral e hipocampo entre o grupo tratado com FB₁ e o grupo controle.
- Não foi observada alteração na imunoreatividade da proteína quinase C após exposição à FB₁ em hipocampo.

De modo geral concluímos que a exposição à FB₁ por 4 dias é capaz de promover alterações em marcadores de estresse oxidativo como NPSH e FRAP em fígado, rim e

pulmão. Já, a nível cerebral, nenhuma alteração foi observada em marcadores de estresse oxidativo em córtex e hipocampo, bem como nenhuma alteração na imunoreatividade da proteína quinase C em hipocampo. Além disso, nos testes comportamentais observou-se que nas condições do protocolo utilizado a FB₁ não provoca alteração em parâmetros locomotores, exploratórios, de memória e aprendizado, causando alterações apenas na ansiedade dos animais. Neste sentido, mais estudos utilizando protocolos de exposição diferentes (dose, tempo) são necessários para elucidar a forma pela qual a FB₁ predispõe alterações em parâmetros de ansiedade, bem como as alterações que a administração de doses menores por períodos mais longos poderia causar nos parâmetros de estresse oxidativo analisados.

REFERÊNCIAS

ABBES, S.; SALAH-ABBES, J.B.; JEBALI, R.; YOUNES, R.B.; OUESLATI, R. Interaction of aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mice causes immunotoxicity and oxidative stress: possible protective role using lactic acid bacteria. **J Immunotoxicol.** v.1, p.1-9, 2015.

ABIDIN, I.; YARGIÇOĞLU, P.; AGAR, A.; GÜMÜSLU, S.; AYDIN, S.; OZTURK, O.; SAHIN, E. The effect of chronic restraint stress on spatial learning and memory: relation to oxidant stress. **Int J Neurosci.** v.114, n.5, p.683-699, 2004.

ABDELLATEF, A.A.; KHALIL, A.A. Ameliorated effects of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis* DSM 20076 and *Pediococcus acidilactici* NNRL B-5627 on Fumonisin B₁ – induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicity in rats. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v.11, n.2, p.326-336, 2016.

BAHLS, S.C. Depressão: uma breve revisão dos fundamentos biológicos e cognitivos. **Interação.** v.3, p.49-60, 1999.

BALMUS, I.M.; CIOBICA, A.; ANTIOCH, I.; DOBRIN, R.; TIMOFTE, D. Oxidative Stress Implications in the Affective disorders: main biomarkers, animal models relevance, genetic perspectives, and antioxidant approaches. **Oxid Med Cell Longev,** 2016.

BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., PAULA, S.O., NININ, V.P.R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: avaliação de marcadores. **J Brazilian Soc. Food Nutri.** v.33, n.2, p.111-128, 2008.

BARREIROS, A.L.B.S., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova.** v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BARTOLOMUCCI, A.; LEOPARDI, R. Stress and Depression: Preclinical Research and clinical implications. **Stress & Depression.** v.4, n.1, p.1-5, 2009.

BENNET, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clin Microbiol Rev,** v.16, p. 497-516, 2003.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. **Anal Biochem,** v.239, n.1, p.70–76, 1996.

BERNABUCCI, U.; COVALECCHIA, L.; DANIELI, P.P.; BASIRICÒ, L.; LACETERA, N.; NARDONE, A.; RONCHI, B. Aflatoxin B1 and fumonisin B1 affect the oxidative status of bovine peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology in vitro.** v.25, p.684-691, 2011.

BERRIDGE, M.J. Neuronal calcium signaling. **Neuron.** v.21, n.1, p.13-26, 1998.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr,** v.12, n.12, p. 123-130, 1999.

BIOMIN. Regional Results of Global Mycotoxin Occurrence Through June 2017. Disponível em: < <http://www.biomin.net/pt/centro-de-conhecimentos/>>. Acesso em: 31 de agosto de 2017.

BLACKSTONE, C., SHENG, M. Postsynaptic calcium signaling microdomains in neurons. **Front Biosci.** v.1, n.7, p.850-872, 2002.

BOEDIN, K. **Avaliação de biomarcadores de exposição humana à fumonisina B₁ nos alimentos em municípios dos estados de São Paulo e Santa Catarina, Brasil.** Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia de Alimentos. Pirassununga, 2015. Disponível em: <file:///C:/Users/c1/Downloads/DO7084484COR.pdf> . Acesso em: 08 de março de 2017.

BOK, J.W.; KELLER, N.P.; LAE, A. A regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. **Eukaryot. Cell**, Washington, v.3, p.527-535, 2004.

BRASIL. Resolução RDC nº 07, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre os limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos.** ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 12 de março de 2017.

BULDER, A.S.; ARCELLA, D.; BOLGER, M.; CARRINGTON, C., KOPODO, K.; RESNIK, K.; RILEY, R.T.; WOLTERINK, G.; WU, F. Fumonisin (addendum). In: 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). World Health Organization (WHO Food Additives Series), n.65, p. 325–794, 2012.

CAROCHO, M., FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.** v.51, p.15-25, 2013.

CASTILLO, A.R.G.L.; RECONDO, R.; ASBAHR, F.R.; MANFRO, G.G. Transtornos da ansiedade. **Rev Bras Psiquiatr**, v.22, p. 20-23, 2000.

CRUZ, A.P.M., LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade e o estudo experimental de drogas serotoninérgicas. Em: Landeira-Fernandez, J. e Fukusima, S. (org), *Métodos em Neurociência*. São Paulo: Manole, p.192-217, 2012.

DEL FAVA, C., LARA, M.C.C.S.H., VILLALOBOS, E.M.C., NASSAR, A.F.C., CABRAL, A.D., TORELLI, C.S., CUNHA, M.S., CUNHA, E.M.S. Ocorrência de leucoencefalomalácia (LEME) em equídeos no Estado de São Paulo, Brasil: achados anatomopatológicos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.47, n.6, p.488-494, 2010.

DIAZ, D.E. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham: Nottingham University Press, 2005.

DINIZ, S.P.S.S. **Micotoxinas**. Livraria e Editora Rural, 2002.

DOMIJAN, A.M. Fumonisin B₁: a neurotoxic mycotoxin. **Arh Hig Rada Toksikol.** v.63, p.531-544, 2012.

DOMIJAN, A.M.; ZELJEZIC, D.; PERAICAL, M.; KOVACEVIC, G.; GREGOROVIC, G.; KRSTANAC, Z.; HORVATIN, K.; KALAFATIC, M. Early toxic effects of fumonisin B₁ in rat liver. **Hum Exp Toxicol.** v.27, p.895-900, 2008.

DUSSE, L.M.S.A., VIEIRA, L.M., CARVALHO, M.G. Revisão Óxido Nítrico. **J Bras Patol e Med Lab.** v.39, n.4, p.343-350, 2003.

EMAN, European Mycotoxin Awareness Network, 2000. Disponível em: <http://www.Mycotoxins.org>. Acesso em: 23 de março de 2017.

ENONGENE, E.N.; SHARMA, R.P.; BHANDARI, N.; VOSS, K.A.; RILEY, R.T. Disruption of sphingolipid metabolism in small intestines, liver and kidney of mice dosed subcutaneously with fumonisin B₁. **Food Chem. Toxicol.** Oxford, v.38, p.793-799, 2000.

ESTRELA, J.B.C.; RIBEIRO, J.S.F. Análise das relações entre memória e aprendizagem na construção do saber. **Caderno Intersaberes**, v.1, n.1, p.140-159, 2012.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) em la prevención y control de las micotoxinas, 2004. Disponível em: www.fao.org/docrep/005/y1390s/y1390s04.htm. Acesso em: 08 de março de 2017.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Segurança e Qualidade alimentar – Micotoxinas, 2017. Disponível em: < <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>>. Acesso em: 31 de agosto de 2017.

FERNANDEZ-TAVEJO, E. O. In: Temas de higiene de los alimentos: Capítulo 9- Micotoxinas en alimentos Ángel E. Caballero Torres, p. 100-115, 2008.

FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras**, v.43, n.1, 1997.

FREIRE, F.C.O.; VIEIRA, I.G.P.; GUEDES, M.I.F.; MENDES, F.N.P. Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical – Documento 110**. 48p., 2007.

HUSSEIN, S.H., BRASELL, J.M., Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v.167, n.2, p.101-134, 2001.

IAMANAKA, B. T.; OLIVEIRA, I.S.; TANIWAKI, M.H. Micotoxinas em alimentos. **Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.7, p.138-161, 2010.

IARC. Internacional Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. v.82, p.301-366, 2002.

IARC. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Mycotoxin control in low- and middle-income countries - edited by Christopher P. Wild, J. David Miller, John D. Groopman. v.09, 2015.

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

JEFCA. Joint FAO/WHO Expert Committee on Foods Additives. **Evaluation of caertain food additives and contaminants**: seventy-fourth report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome. 2011.

JOHNSON, V.J.; SHARMA, R.P. Gender-dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B₁. **Int Immunopharmacol.** v.1, n.11, p.2023-2034, 2001.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biol.** v.1, n.1, p.244-257, 2013.

KAWASHIMA, L.M., VALENTE SOARES, L.M. Incidência de Fumonisina B₁, Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, Ocratoxina A e Zearalenona em produtos de milho. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v.26, n.3, p.516-521, 2006.

KELLERMAN, T.S., MARASAS, W.F.O., THIEL, P.G., GELDERBLUM, W.C.A., CAWOOD, M., COETZER, J.A.W. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B₁. **J. Vet. Res.** v.57, p.269-75, 1990.

LAZZARI, F. A. **Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações**. 2ed. Curitiba: Ed. do Autor, 1997.

LENT, R. Cem bilhões de neurônios – Conceitos Fundamentais de Neurociência. Editora Athneu. São Paulo, 2005.

LINO, C.M., SILVA, L.J.G., PENA, A.S. Fumonisin: presença em alimentos, implicações na saúde e aspectos legislativos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.** v.99, p.181-192, 2004.

LOBO, V., PATIL, A., PHATAK, A., CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn Rev.** v.4, n.8, p.118-126, 2010.

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

MAGAN, N., OLSEN, M. Mycotoxins in food: Detection and control. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England, 2004.

MALLMANN, C.A.; DIKIN, P.; MALLMANN, A.O.; TYSCA, D. Mycotoxin: impacts and control strategies. Zopollato M, Muraro GB and Nussio LG (eds) In: Proceedings of

International Symposium Forage Quality Conservation. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz (FEALQ), 2009.

MANELA-AZULAY, M., MANDARIM-DE-LACERDA, C.A., PEREZ, M.A., FILGUEIRA, A.L., CUZZI, T. Vitamina C. **Na bras Dermatol.** v.78, n.3, p.265-274, 2003.

MARASAS, W.F.O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environ. Health Perspect.**, v.109, p.239-243, 2001.

MARASAS, W.F.O., KELLERMAN, T.S., GELDERBLUM, W.C.A., COETZER, J.A.W., THIEL, P.G., VAN DER LUGT, J.J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **J. Vet. Res.** v.55, p.197-203, 1998.

MARIN, S., RAMOS, A.J., CANO-SANCHO, G., SANCHIS, V. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food Chem. Toxicol.** v.60, p.218-237, 2013.

MARTELLI, F., NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Cienc. Cult.** v.66, n.3, p.54-57, 2014.

MARTINS, F.A.; FERREIRA, F.M.D.; FERREIRA, F.D.; BANDO, E.; NERILO, S.B.; HIROOKA, E.Y.; MACHINSKI JR, M. Daily intake estimates of fumonisins in corn-based products in the population of Parana, Brazil. **Food Control**, v.26, p.614-618, 2012.

MARY, V.S.; THEUMER, M.G.; ARIAS, S.L.; RUBINSTEIN, H.R. Reactive oxygen species sources and biomolecular oxidative damage induced by aflatoxin B1 and fumonisin B1 in rat spleen mononuclear cells. **Toxicology**, v.302, n.2, p.299-307, 2012.

MILLER, J.D.; TRENHOLM, H.L. **Mycotoxins in Grain: compounds other than Aflatoxin**. 2ed. Minnesota: Eagan Press, 1997.

MINAMI, L., MEIRELLES, P.G., HIROOKA, E.Y., ONO, Y.S. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias**, v.25, n.3, p.207-224, 2004.

MISSMER, S.A., SUAREZ, L., FELKNER, M., WANG, E., MERRILL JR, A.H., ROTHMAN, K.J., HENDRICKS, K.A. Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. **Environ. Health Perspect.** v.114, p.237-241, 2006.

MORGAVI, D.P., RILEY, R.T. An historical overview of field disease outbreaks known or suspected to be caused by consumption of feeds contaminated with *Fusarium* toxins. **Anim. Feed Sci. Technol.** v.137, p.201-212, 2007.

MÜLLER, C.P.; REICHEL, M.; MÜHLE, C.; RHEINA, C.; GULBINS, E.; KORNHUBER, J. Brain membrane lipids in major depression and anxiety disorders. **Biochim Biophys Acta.** v.1851, p.1052-1065, 2015.

NADJA, B.; LARABA-DJEBARI, F. Beneficial effects of *Androctonus australis* venom and its non-toxic fraction in the restoration of early hepatocyte- carcinogenesis induced by FB₁

mycotoxin: Involvement of oxidative biomarkers. **Exp. Molec. Path.** v.99, n.2, p.198-206, 2015.

NETO, A.S.S.R. **Glutathiona – Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010.

OGA, S., CAMARGO, M.M.A., BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia.** 4ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

OMAYE, S.T., TURNBULL, J.D., SAUBERLICH, H.E. Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. **Methods Enzymol.** v.62, p.3–11, 1979.

OSUCHOWSKI, M.F., EDWARDS, G.L., SHARMA, R.P. Fumonisin B₁-induced neurodegeneration in mice after intracerebroventricular infusion is concurrent with disruption of sphingolipid metabolism and activation of proinflammatory signaling. **Neuro Toxicology.** v.26, n.2, p.211-221, 2005.

PEREIRA, K.C., SANTOS, C.F. Micotoxinas e seu potencial carcinogênico. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.** v.15, n.4, 2011.

PEREGRINO, A. Ansiedade Normal e Patológica. **J Bras Psiquiat,** v.45, n.3, p.129-134, 1996.

PIRES, A.S.S. **Citotoxicidade da vitamina C em células tumorais – Estudos in vitro e in vivo através de métodos bioquímicos e de imagiologia nuclear.** Dissertação (Mestrado em Física). Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

POERSCH, A.B.; TROMBETTA, F.; BRAGA, A.C.; BOEIRA, S.P.; OLIVEIRA, M.S.; DILKIN, P.; MALLMANN, C.A., FIGHERA, M.R.; ROYES, L.F.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F. Involvement of oxidative stress in subacute toxicity induced by fumonisin B₁ in broiler chicks. **Vet. Microbiol.,** v.174, p.180-185, 2014.

PORTER, J.K.; VOSS, K.A.; CHAMBERLAIN, W.J.; BACON, C.W.; NORRED, W.P. Neurotransmitters in rats fed fumonisin B₁. **Proc Soc Exp Biol Med,** v.202, p.360-364, 1993.

POZZI, C. R.; ARCADE, J. R. P.; JUNIOR, I. A.; FAGUNDES, H., CORRÊA, B. Aspectos Relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de Fumonisininas. **Cienc Rural,** v.32, n.5, 2002.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., FLOWER, R.J., HENEERSON, G. **Farmacologia.** 7^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ROCHA, L.O., NAKAI, V.K., BRAGHINI, R., REIS, T.A., KOBASHIGAWA, E., CORRÊA, B. Mycoflora and Co-Occurrence of Fumonisin and Aflatoxins in Freshly Harvested Corn in Different Regions of Brazil. **Int J Mol Sci.** v.10, n.11, p.5090-5103, 2009.

RODRIGUES, N.R.D. **Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário pós-natal.** Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ROVER J. L., HÖEHR, N.F., VELLASCO, A.P., KUBOTA, L.T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quím Nova.** v.24, n.1, p.112-119, 2001.

SALLES-GOMES, T.L., ALMEIDA, P.E., MOREIRA, M., CANOLA, J.C., CANOLA, P.A., SOUZA, A.H. Surto de leucoencefalomalácia equina provocada por ração comercial com concentração de fumonisina inferior a 10 ppm. **Ars Veterinaria.** v.19, n.3., p.267-271, 2003.

SILVA, C.T., JASIULIONIS, M.G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura.** v. 66, n.1, 2014.

SILVA, R.H.; ABILIO, V.C.; TAKATSU, A.L.; KAMEDA, S.R.; GRASSL, C.; CHEHIN, A.B.; MEDRANO, W.A.; CALZAVARA, M.B.; REGISTRO, S.; ANDERSEN, M.L.; MACHADO, R.B.; CARVALHO, R.C.; RIBEIRO, R.A.; TUFKI, S.; FRUSSA-FILHO, R. Role of hippocampol oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. **Neuropharmacology**, v.46, p.895-903, 2004.

SCUSSEL, V.M. **Micotoxinas em Alimentos.** Florianópolis: Insular, 1998.

SHIBAMOTO, T.; BJELDANES, L.F. **Introdução à Toxicologia dos Alimentos.** 2ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

SOARES, C.; ABRUNHOSA, L.; VENÂNCIO, A. Fungos produtores de micotoxinas: impactos na segurança alimentar. **Portuguese Society for Microbiology Magazine**, Braga, Portugal, 2013.

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

STOCKMANN-JUVALA, H., SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B₁. **Hum Exp Toxicol.** v.27, p.799-809, 2008.

STREHLER, E.E., ZACHARIAS, D.A. Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. **Physiol. Rev.** v.81, n.1, p.21-50, 2001.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neurosci Biobehav Rev**, v.9, p.203-222, 1985.

TSIKAS, D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. **FRA.** v.39, n.8, p.797-815, 2005.

TSUNODA, M.; DUGYALA, R.R.; SHARMA, R.P. Fumonisin B₁ induced increases in neurotransmitter metabolite levels in different brain regions of BALB/c mice. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**, v.120, p.457-465, 1998.

TURNER, P.C., NIKIEMA, P., WILD, C.P. Fumonisin contamination of food: progress in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutat Res**, v.443, p.81-93, 1999.

VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; BENFATO, M.S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. **J Environ Sci Heal Part C**. v.27, p.120-139, 2009.

VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; MEREDITH, F.I.; HOWARD, P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER, J.K. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Eviron Health Perspect**, v.109, p.259-266, 2001.

VOSS, K.A.; HOWARD, P.C.; RILEY, R.T.; SHARMA, R.P.; BUCCI, T.J.; LORENTZEN, R.J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B1: a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (= *F. verticillioides*). **Cancer Detect Prev**, v.26, p.1-9, 2002.

WANG, Z.; LI, S.; CAO, Y.; TIAN, X.; ZENG, R.; LIAO, D.F.; CAO, D. Oxidative stress and carbonyl lesion in ulcerative colitis and associated colorectal cancer. **Oxid Med Cell Longev.**, v.2016, p.15, 2016.

WASKIEWICZ, A.; BEZSTERDA, M.; GOLINSKI, P. Occurrence of fumonisins in food - An interdisciplinary approach to the problem. **Food Control**, v.26, p.491-499, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Technical Report Series 966. Seventy-fourth of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Rome, Italy, 2011.

ZAIN, M.E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **J Saudi Chem Soc.**, n.15, p.129-144, 2011.

ANEXOS

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



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação de efeitos comportamentais e bioquímicos induzidos pela exposição à fumonisina B1 em camundongos.", protocolado sob o CEUA nº 6775010416, sob a responsabilidade de **Ana Flávia Furian** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFMS) em reunião de 14/04/2016.

We certify that the proposal "Evaluation of behavioral and biochemical effects induced by exposure to fumonisin B1 in mice", utilizing 72 Isogenics mice (72 males), protocol number CEUA 6775010416, under the responsibility of **Ana Flávia Furian** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFMS) in the meeting of 04/14/2016.

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 06/2016

Área: [Farmacologia](#)

Procedência: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [45 a 60 dias](#)

N: [72](#)

Linhagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 30 g](#)

Resumo: As micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas por diversas espécies de fungos durante seu metabolismo secundário e que podem contaminar os alimentos durante várias etapas do seu desenvolvimento e processamento. Dentre as espécies produtoras de micotoxinas destacam-se as pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. As fumonisinas representam um grupo de cerca de 16 compostos tóxicos produzidos por fungos do gênero *Fusarium*, em especial *Fusarium verticillioides* (anteriormente classificado como *F. moniliforme*), sendo a fumonisina B1 considerada a de maior toxicidade. A contaminação de seres humanos e animais pelas micotoxinas ocorre através da ingestão de alimentos ou produtos derivados contaminados. No caso das fumonisinas, o milho e seus derivados consistem na maior fonte de contaminação, sendo relatadas graves manifestações tanto em animais quanto em humanos, após o consumo de produtos contaminados com as mesmas. O mecanismo de toxicidade das fumonisinas relaciona-se a alterações causadas pelas mesmas no metabolismo de esfingolipídios, resultando em alterações nos processos de regulação, diferenciação e morte celular. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo determinar os efeitos tóxicos após exposição à fumonisina B1 em camundongos, correlacionando déficits locomotores, de memória e ansiedade a esta intoxicação, além de avaliar marcadores bioquímicos e morfológicos que indiquem um possível dano celular e mecanismo de ação tóxica. Após o tratamento com a micotoxina por 4 dias, serão realizados testes comportamentais a fim de avaliar parâmetros de locomoção, ansiedade, aprendizado, memória e depressão □ teste de campo aberto, rotarod, labirinto em cruz elevado, reconhecimento de objetos, nado forçado e preferência por sacarose □ dosagem de parâmetros de estresse oxidativo pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona-S-transferase (GST), carbonilação proteica e níveis de 3-nitrotirosina, atividade da enzima Na⁺/K⁺ ATPase, determinação de ácido ascórbico, determinação de tióis não-proteicos (NPSH) e avaliação da peroxidação lipídica pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como alterações na morfologia e imunoreatividade da proteína quinase A (PKA-Ser96) e proteína quinase C (PKC-Ser957). A determinação do poder antioxidante usando ferro reduzido (FRAP) também será realizada. Os resultados obtidos permitirão uma visão mais ampla dos efeitos da FB1 a nível comportamental e bioquímico.

Santa Maria, 15 de abril de 2016



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria