



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

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE
AFLATOXINA B1 NAS CONVULSÕES INDUZIDAS
EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Francielle Trombetta

Santa Maria, RS, Brasil
2014

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE AFLATOXINA B1 NAS CONVULSÕES INDUZIDAS EM RATOS

por

Francielle Trombetta

Dissertação apresentada no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia: Neuropsicofarmacologia e Imunofarmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**

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

Santa Maria, RS, Brasil.
2014

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

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

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DA AFLATOXINA B1 NAS
CONVULSÕES INDUZIDAS EM RATOS**

elaborada por
Francielle Trombetta

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

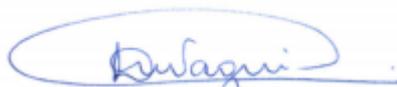
COMISSÃO EXAMINADORA:



Ana Flávia Furian, Dra. (Orientadora)



Roselei Fachinetto, Dra. (UFSM)



Danieli Valnes Magni, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 14 de Agosto de 2014.

*Aos meus pais, Carlos e Cleusa,
meus exemplos, pelo incentivo,
amor e apoio incondicional
durante todos esses anos.*

*Ao Daniel meu namorado, por
me apoiar com seu amor,
carinho, amizade, atenção e
muita paciência.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre atender meus pedidos, e estar presente em todos os momentos de minha vida fazendo com que eu tenha persistência.

À minha orientadora, Prof^ª. Dra Ana Flávia Furian, pela oportunidade de fazer o mestrado, pela confiança depositada cegamente em mim, por seus ensinamentos valiosos que levarei sempre comigo, pelo exemplo de pessoa, competência profissional, caráter, humildade, amizade e especialmente pela paciência. Minha gratidão e todo o meu respeito.

Ao Prof. Dr. Mauro Oliveira pelo suporte estatístico, auxílio no decorrer deste trabalho e principalmente pelo exemplo de pessoa, é um grande professor no qual me espelho.

Aos meus pais, Carlos e Cleusa que são a minha base, meus exemplos, por acreditar sempre em meus sonhos, sei que muitos dos seus sonhos foram sacrificados em prol dos meus, por me darem muito amor, carinho, segurança, palavras de incentivo e principalmente apoio incondicional sempre em toda a minha vida. Amo muito vocês.

Ao Mario e a Zete que se tornaram meus segundos pais, pelo carinho, incentivo, torcida, ajuda e por emprestar o Dani em momentos que ele poderia estar com vocês. Muito Obrigada!!

Ao meu amor, Daniel, agradeço pelo companheirismo, pelo apoio, incentivo, dedicação, paciência em todos os momentos e principalmente pelo amor e carinho. Te amo e muito obrigada!

A toda minha família que sempre me apoio, torceu, rezou, incentivou principalmente meus avós.

A Naieli, minha irmã de coração, agradeço pela amizade, está que levarei sempre para o resto da vida, pelo companheirismo, dedicação, incentivo, otimismo, bom humor, por estar incansavelmente ao meu lado durante a realização deste trabalho, quero que saiba que é muito bom trabalhar com você e pode contar comigo sempre. Obrigada Nai!!

Ao meu amigo Josiel pro ter me incentivado para vim fazer o mestrado!

Aos meus colegas de laboratório LABNEURO, Vinicius, Leandro, Naieli, Ana Claudia, Leticia, Maiara, Alice, Clarissa, Jéssica, Camilla, Thais e Ana, pela convivência, ensinamentos, auxílio. A Gerusa pela amizade, dicas, ensinamentos e apoio.

Ao Dr. Leandro pelos ensinamentos, paciência e amizade no decorrer deste trabalho.

Ao laboratório da prof. Rose pelo empréstimo dos aparelhos e materiais e principalmente pela atenção e disponibilidade.

Ao laboratório BIOEX, pelo espaço, matérias e principalmente pela amizade, risadas, companheirismo, ensinamentos, dicas, em especial para o Iuri pelo auxílio. Muito Obrigada!!

Aos professores do programa de pós-graduação em farmacologia que contribuíram para minha formação. A Zeli por sua dedicação, sempre muito atenciosa e prestativa.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade e oferta de ensino de qualidade.

A CAPES e a FAPERGS, que garantiram o sustento financeiro necessário à realização deste trabalho de mestrado.

A todos que de alguma maneira me ajudaram na realização deste trabalho, quero agradecer e compartilhar esta vitória. MUITO OBRIGADO!!

“Seja qual for o caminho que optarmos seguir, haverá altos e baixos. E isso é tudo. Se fizermos uma auditoria em nossas vidas, em algum momento questionaremos: “e se eu tivesse feito diferente”? O diferente teria sido melhor e teria sido pior. Então o jeito é curtir nossas escolhas e abandoná-las quando for preciso, mexer e remexer na nossa trajetória, alegrar-se e sofrer, acreditar e descrer, que lá adiante tudo se justificará, tudo dará certo.”

Martha Medeiros

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil.

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO ORAL DE AFLATOXINA B1 NAS CONVULSÕES INDUZIDAS EM RATOS

Autor: Francielle Trombetta
Orientadora: Ana Flávia Furian
Data e Local da defesa: Santa Maria, 14 de Agosto de 2014.

As aflatoxinas são produzidas principalmente pelos fungos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. A aflatoxina B1 (AFB1) é a micotoxina mais frequente e altamente tóxica, apresenta efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Esta micotoxina tem sido detectada em culturas de importância em todo o mundo, como milho, amendoim, feijão, arroz, trigo, algodão, sorgo, frutas e também em rações de animais. A AFB1 exerce seus efeitos após sua conversão hepática em 8,9-epóxido, pela ação de enzimas do citocromo P-450, o qual reage com macromoléculas celulares, incluindo proteínas, RNA e DNA. Além disso, há um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio, alteração do desempenho neurocomportamental, prejuízos à coordenação motora, e diminuição dos níveis proteicos. Estudos revelam que a AFB1 altera os níveis de neurotransmissores como a norepinefrina, serotonina e dopamina, e sabe-se que estas alterações influenciam no comportamento dos animais, como também inibe a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase, enzima que no cérebro, é essencial para a manutenção do gradiente eletroquímico, manutenção dos potenciais de repouso e liberação e captação de neurotransmissores. Assim, uma diminuição da atividade Na^+, K^+ -ATPase pode ocasionar aumento da excitabilidade neuronal, facilitando a ocorrência de convulsões. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a influência da AFB1 em facilitar as convulsões induzidas por uma dose subconvulsivante de pentilenotetrazol (PTZ), e avaliar seus efeitos tóxicos sobre o cérebro, através da determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e parâmetros de estresse oxidativo após a exposição aguda à AFB1 em ratos. Foi realizado o registro eletroencefalográfico dos animais após a administração oral aguda de AFB1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$) seguida por uma dose subconvulsivante de pentilenotetrazol (30 mg/kg , i.p.). A administração prévia da AFB1 ao PTZ reduziu a latência das mioclonias, não alterou a amplitude global das ondas cerebrais, e a exposição concomitante ao PTZ reduziu a atividade total, $\alpha 1$ e $\alpha 2/\alpha 3$ da enzima Na^+, K^+ -ATPase no córtex cerebral. No hipocampo, a AFB1 e o PTZ reduziram a atividade total e $\alpha 2/\alpha 3$ da Na^+, K^+ -ATPase. A AFB1 não alterou a atividade da catalase (CAT) e da glutational-S-transferase (GST) no córtex cerebral dos animais. Concluímos que a AFB1 exerce efeito neurotóxico, facilitando as convulsões induzidas por PTZ, possivelmente devido à redução da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase.

Palavras chave: Aflatoxina B1, Na^+, K^+ -ATPase, estresse oxidativo, neurotoxicidade, convulsões, pentilenotetrazol.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil.

EFFECT OF ORAL ADMINISTRATION OF AFLATOXIN B1 IN PENTYLENETETRAZOL-INDUCED SEIZURES IN RATS

Author: Francielle Trombetta

Advisor: Ana Flávia Furian

Place and date: Santa Maria, August, 14th, 2014.

Aflatoxins are produced by *Aspergillus flavus* fungi, mainly *A. parasiticus* and *A. nomius*. Aflatoxin B1 (AFB1) is the most common and highly toxic mycotoxin, presents carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects. This mycotoxin has been detected in cultures of worldwide importance such as maize, groundnuts, beans, rice, wheat, cotton, sorghum, fruit and also in animal feed. AFB1 exerts its effects after its conversion into liver 8,9-epoxide by the action of cytochrome P-450, which reacts with cellular macromolecules, including proteins, RNA and DNA. Furthermore, there is an increase in levels of reactive oxygen species, altered neurobehavioral performance, damage to motor coordination, and decreased protein levels. Studies show that AFB1 alter the levels of neurotransmitters such as norepinephrine, serotonin and dopamine, and it is known that these changes influence the behavior of animals, also inhibits the activity of the enzyme Na⁺, K⁺-ATPase. This enzyme in the brain is essential for the maintenance of the electrochemical gradient, maintenance of resting potential and the release and uptake of neurotransmitters. Thus, a decrease in activity Na⁺, K⁺-ATPase could cause increased neuronal excitability, facilitating the occurrence of seizures. Thus, the aim of this study was to investigate the influence of AFB1 in facilitating seizures induced by a subconvulsant dose of pentylenetetrazol (PTZ), and evaluate its toxic effects on the brain, by determining the activity of Na⁺, K⁺-ATPase and oxidative stress parameters after acute exposure to AFB1 in rats. EEG recording of the animals was performed after acute oral administration of AFB1 (250 mg/kg) followed by a subconvulsant dose of pentylenetetrazol (30 mg/kg, ip). Prior administration of AFB1 to PTZ reduced the latency of myoclonus, did not alter the total amplitude of the brain waves, and concomitant exposure to PTZ reduced the activity total, $\alpha 1$ and $\alpha 2/\alpha 3$ of the enzyme Na⁺, K⁺-ATPase in the cerebral cortex. In the hippocampus, the AFB1 and PTZ reduced total and $\alpha 2/\alpha 3$ activity of the Na⁺, K⁺-ATPase. The AFB1 not alter the activity of catalase (CAT), and glutathione-S-transferase (GST) in the cerebral cortex of animals. We conclude that AFB1 exerts neurotoxic effect, facilitating seizures induced by PTZ possibly by inhibiting Na⁺, K⁺-ATPase activity.

Key-words: Aflatoxin B1, Na⁺,K⁺-ATPase, oxidative stress, neurotoxicity, seizures, pentylenetetrazol

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Figure 1 – Representative electroencephalographic recordings after (A) DMSO, □ indicates the start of the administration of DMSO; (B) arrow indicates administration of PTZ; (C) AFB1, ● indicates the start of the administration of AFB1; (D) arrow indicates administration of PTZ. Figure A shows the basal period (5 min), and 15 minutes of the period of the administration of DMSO (vehicle). Figure B represents the last 5 minutes from DMSO and the whole period (15 min) of PTZ administration. Figure C shows basal period (5 min), and 15 minutes of the period of the administration of AFB1. Figure D represents the last 5 minutes from AFB1 and the whole period (15 min) of PTZ administration. Figure E shows amplitude quantification minute for minute for the entire record. The quantification of the amplitude is calculated for periods shown in the figure F, and Figure G shows the latency to myoclonic seizure. * Indicates a significant difference compared with vehicle group. # Indicates a significant difference compared with AFB1 group..... 53

Figure 2 – Effect of exposition to AFB1 (250 µg/kg v.o.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na⁺,K⁺-ATPase (2A), α1 (2B) and α2/α3 (2C) subunit in cerebral cortex of rats. Data are mean + S.E.M, n=6-7 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with vehicle group..... 55

Figure 3 – Effect of exposition to AFB1 (250 µg/kg v.o.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na⁺,K⁺-ATPase (3A), α1 (3B) and α2/α3 (3C) subunit in hippocampus of mice. Data are mean + S.E.M, n =5-7 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with vehicle group..... 56

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1 – Effect of exposition to AFB1 (250 µg/kg v.o.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on CAT activity and GST activity of cerebral cortex of rats	57
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AFB1	Aflatoxina B1
AFB2	Aflatoxina B2
AFM1	Aflatoxina M1
AFP1	Aflatoxina P1
AFQ1	Aflatoxina Q1
ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
CYP	Funções oxidases mistas
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPAC	Ácido 3,4-diidroxifenilacético
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAL	Fosfatase Alcalina
GPx	Glutathione Peroxidase
GSH	Glutathione
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
HVA	Ácido Homovanílico
i.p.	Intraperitoneal
K⁺	Potássio

MDA	Malonaldeído
Na⁺	Sódio
NE	Norepinefrina
O₂	Oxigênio
O₂•	Radical Superóxido
PTZ	Pentilenotetrazol
RL	Radical livre
RNA	Ácido Ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido Dismutase
TAC	Capacidade Antioxidante Total
v.o.	Via Oral
γ-GT	Gamaglutamiltransferase
•OH	Radical hidroxila

SUMÁRIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo Geral.....	19
2.2. Objetivos Específicos.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. Micotoxinas	21
3.2. Aflatoxinas	23
3.2.1. Características Físico-Químicas das aflatoxinas.....	23
3.2.2. Legislação.....	25
3.2.3. Metabolismo das aflatoxinas.....	26
3.2.4. Toxicidade das aflatoxinas.....	28
3.3. Estresse Oxidativo e aflatoxinas	29
3.3.1. Radicais livres e estresse oxidativo.....	29
3.3.2. Estresse oxidativo e sistema nervoso central.....	31
3.3.3. Defesas enzimáticas.....	32
3.4. Neurotoxicidade e aflatoxina	34
3.5. Na⁺,K⁺-ATPase	35
3.5.1. Estrutura da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	36
3.5.2. Mecanismo de Regulação.....	37
3.5.3. Aspectos Fisiológicos e Patológicos da Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase no cérebro.....	38
4. ARTIGO CIENTÍFICO	40
5. CONCLUSÃO	62
5.1. Conclusão Geral	63
5.2. Conclusões Específicas	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários biologicamente ativos em sua maioria produzidos por certas espécies de fungos *Aspergillus* (Bedard and Massey, 2006), principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. (Coppock, 2012; Varga, 2009). Há muitas aflatoxinas, como a aflatoxina B1, B2, G1, G2 e, dentre as quais a aflatoxina B1 (AFB1) é a mais frequente e tóxica do grupo (Abdel-Wahhab et al., 1998; Wogan et al., 1971). A contaminação de alimentos por aflatoxinas continua a ser um importante problema de saúde pública no mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde foi relatada que a exposição à aflatoxina é associada com aproximadamente 40% das doenças (Williams et al., 2004).

A população em geral está exposta as aflatoxinas principalmente através do consumo de alimentos contaminados, tais como especiarias, grãos de cereais, sementes oleaginosas, milho e produtos de milho, caroço de algodão, amendoim e produtos de amendoim, nozes, bebidas fermentadas feitas a partir de grãos, leite, queijo, carne, nozes, e sucos de fruta podem ser contaminados com aflatoxinas (Bullerman, 1986). A contaminação é maior em plantas cultivadas em climas quentes, úmidos e tropicais em geral, mas também pode ocorrer em climas temperados que variam de ano para ano (IARC, 1976; Program, 2011). Conseqüentemente, as aflatoxinas podem invadir a oferta de alimentos a qualquer momento durante a produção, processamento, transporte e armazenamento. Evidências de aflatoxicoses agudas em humanos têm sido relatadas principalmente em países em desenvolvimento, que carecem de recursos efetivos para a fiscalização da presença de aflatoxinas nos alimentos (Simjee, S., 2007). Estima-se que a presença das aflatoxinas em alimentos e ar poluído tem um impacto negativo em até 5 bilhões de pessoas que vivem em climas quentes e úmidos (Williams et al., 2004).

A AFB1 é metabolizada no fígado, pelo sistema do citocromo P450 para o metabólito altamente reativo AFB1-8,9-epóxido, o qual é responsável pela toxicidade (Garner, 1979; Williams et al., 2004). O metabólito 8,9-epóxido é eliminado por conjugação com glutathione, em uma reação mediada pela enzima glutathione-S-transferase.

A AFB1 é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer como Grupo 1 de carcinógenos humanos (IARC, 1993). Os sintomas em humanos da aflatoxicose aguda manifestam-se por vômitos, dor abdominal, edema pulmonar, coma, convulsões, morte com edema cerebral, acúmulo de gordura no fígado, rins e coração (Strosnider et al., 2006).

Uma das manifestações da toxicidade induzida por AFB1 é o estresse oxidativo (Souza et al., 1999). O estresse oxidativo ocorre quando a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) domina a capacidade do sistema para neutralizar e eliminá-los. EROs são os radicais livres de ânions reativos formados por incompleta redução de um elétron de oxigênio incluindo ânion superóxido ($O_2\bullet$) e radical hidroxila ($\bullet OH$) (C., 1999). O aumento do nível de EROs geralmente resulta da falta ou perturbação funcional das moléculas antioxidantes ou devido à superprodução de EROs (Sohal and Weindruch, 1996). Vários estudos mostram a participação do estresse oxidativo nos efeitos tóxicos induzidos pela AFB1, e atribuem a este fato a hepatotoxicidade característica induzida por esta micotoxina. Sugere-se que os efeitos tóxicos da AFB1 são mediados pelo aumento da produção de espécies reativas como o $O_2\bullet$, $\bullet OH$ e o H_2O_2 durante o metabolismo hepático desta micotoxina (Towner et al., 2003).

Além disso, dentre as diversas proteínas constituintes da membrana neuronal, destaca-se a enzima Na^+ , K^+ -ATPase, que é particularmente sensível ao estresse oxidativo (Jamme et al., 1995; Morel et al., 1998). No cérebro, cerca de 50% do ATP ou mais é consumido pela Na^+ , K^+ -ATPase, (Erecinska and Silver, 1994), e a atividade desta enzima é essencial para a manutenção do gradiente eletroquímico, modulação dos potenciais de repouso e liberação de neurotransmissores (Stahl and Harris, 1986). Desta forma, a Na^+ , K^+ -ATPase, pode ser alvo de neurotransmissores, hormônios e outras substâncias que, agindo diretamente na enzima ou através de suas vias de sinalização intracelulares específicas, podem regular a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, através da fosforilação de resíduos específicos nesta enzima, principalmente na subunidade α (Therien and Blostein, 2000). Além disso, uma disfunção na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, pode causar oscilações no potencial de membrana, levando a despolarização prolongada e/ou repetitivas, as quais são características de neurônios de indivíduos epiléticos. Além disso, uma significativa correlação entre a inibição desta enzima e os déficits cognitivos em diversos modelos de doenças neurodegenerativas como doença de Alzheimer e Parkinson foram evidenciadas em alguns estudos (Bagh et al., 2008; Jovicic et al., 2008; Kong et al., 2005).

Assim, este estudo teve como objetivo investigar a influência da AFB1 na facilitação de convulsões induzidas por uma dose subconvulsivante de PTZ, e investigar seus efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central através da determinação da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase e parâmetros de estresse oxidativo após exposição aguda à micotoxina em ratos.

2. OBJETIVOS

2.1 – Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi verificar a influência da AFB1 em facilitar as convulsões induzidas por uma dose subconvulsivante de PTZ, e investigar seus efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central pela determinação da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase e parâmetros de estresse oxidativo após exposição aguda à micotoxina em ratos.

2.2 - Objetivos Específicos

1 – Determinar o efeito da exposição aguda à AFB1 na latência para o desenvolvimento de mioclonias induzidas por PTZ;

2- Determinar o efeito da exposição aguda à AFB1 na amplitude do registro eletroencefalográfico de ratos submetidos à indução de convulsão por PTZ;

3- Determinar a atividade da enzima Na⁺, K⁺ ATPase em córtex cerebral e hipocampo de ratos expostos agudamente a AFB1 e PTZ.

4- Avaliar a atividade da enzima catalase em córtex cerebral de ratos expostos agudamente a AFB1 e PTZ.

5- Avaliar a atividade da enzima glutatona S-transferase em córtex cerebral de ratos expostos agudamente a AFB1 e PTZ.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- Micotoxinas

Os fungos por sua versatilidade em se adaptar podem causar efeitos indesejáveis para a agricultura e indústria de alimentos, são ubíquos na natureza, sendo capazes de persistir no solo, vegetação e água (Moss, 1992). Fungos denominados toxigênicos além de depreciarem produtos destinados à alimentação são capazes de produzir as micotoxinas (Sharma, 1991). Definiu-se que para uma substância ser caracterizada como micotoxina, esta deve: ser causadora de doenças em homens ou animais, ocorrer na natureza, ser produzida por fungos e ser aguda ou cronicamente tóxica (Pastore, 2004).

Micotoxinas são metabólitos tóxicos secundários produzidos por vários fungos filamentosos, (Malmann, 2007) que se desenvolvem naturalmente em produtos alimentícios, sendo formados no estágio final da fase exponencial de crescimento e não são essenciais para o desenvolvimento fúngico (Santin, 2005). São compostos orgânicos, tendo como principais características, baixo peso molecular, amplo espectro de toxicidade, baixa capacidade imunogênica, atuam em pequenas concentrações, e são termoestáveis (Bok and Keller, 2004). O desenvolvimento fúngico é favorecido em climas tropicais e subtropicais como o do Brasil, que oferecem fatores como temperatura e umidade, mas outros fatores não relacionados com o clima, como durante e após a colheita, transporte, processamento e principalmente o armazenamento do produto, que também favorecem o desenvolvimento de micotoxinas. A ausência de sinais aparentes de contaminação por fungos não significa que o alimento encontra-se livre de toxinas, já que elas podem permanecer no produto mesmo depois do desaparecimento dos fungos responsáveis por sua produção (Sabino, 1996). Em todo o mundo a exposição humana as micotoxinas pelo consumo de alimentos é uma questão de saúde pública (Brera C; Miraglia M; Colatosti, 1998; Goldblatt, 1977; Smith et al., 1995). Sua entrada no organismo geralmente se dá pela via digestória e sua absorção comumente causa reações sob a forma de hemorragias, ou mesmo, necroses. Muitas destas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, frequentemente os mais atingidos são o fígado, os rins e o sistema nervoso (Santurio, 2000).

A presença de micotoxinas em alimentos e derivados afeta o agronegócio de muitos países, não sendo um problema apenas de países em desenvolvimento interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola e, em alguns países, afetando, também, a saúde humana (Jelinek et al., 1989; Leung et al., 2006; Miller, 1995). Aproximadamente 25% a 50% de todas as commodities produzidas no mundo, especialmente

os alimentos básicos, estão de alguma forma contaminadas com micotoxinas sendo demonstrado por cálculos confiáveis (Bhat, 1991; Mannon, 1985). Os grãos contaminados com micotoxinas e fungos toxigênicos, podem ocasionar, além de problemas de saúde, perdas econômicas consideráveis já que lotes contaminados devem ser descartados (Bhatnagar et al., 2003). A FAO (Food and Agriculture Organization) avalia uma perda mundial de 25% dos grãos produzidos (Vieira, 1995).

As micotoxinas são capazes de entrar nas cadeias alimentares humanas e animais por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando qualquer ingrediente foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo que durante o processamento o fungo tenha sido eliminado, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. A contaminação direta ocorre quando o produto (alimento ou ração) se torna contaminado por um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas. Alimentos e rações em sua grande maioria podem permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos, tanto durante a produção, quanto durante o processamento, o transporte e o armazenamento (Frisvad, 1992). A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente pela ingestão de produtos contaminados, vegetais, produtos derivados tais como leite, queijo, carnes e outros produtos animais (Smith et al., 1995), podendo causar micotoxicoses.

Micotoxicoses são enfermidades causadas por micotoxinas, que possuem sinais e sintomas como: lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genotoxicidade, podendo causar à morte, e também apresentam efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (Cole, 1981; JECFA, 2001; JECFA., 1995; JECFA., 1998). Os principais gêneros de fungos envolvidos em casos de micotoxicoses são *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, mas existem também espécies produtoras de toxinas em outros gêneros (Sabino, 1996). Atualmente são conhecidas mais de quinhentas micotoxinas, produzidas por aproximadamente uma centena de fungos. As principais micotoxinas podem ser divididas em três grupos: Aflatoxinas produzidas por fungos do gênero *Aspergillus* como *A. flavus* e *A. parasiticus*; Ocratoxinas produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, e as Fusariotoxinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (Malmann, 2007).

3.2. – Aflatoxinas

As aflatoxinas são metabólitos secundários biologicamente ativos em sua maioria produzidos por certas espécies de fungos *Aspergillus* (Bedard and Massey, 2006), principalmente por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Outros fungos produtores de aflatoxinas conhecidos são *A. bombycis*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* e *A. pseudotamarii* (Coppock, 2012; Varga, 2009), encontrados com frequência na natureza. As aflatoxinas apresentam incidência relativamente maior em países de clima tropical ou subtropical, onde os fungos têm temperatura e umidade favoráveis para o seu crescimento (Moss, 1998).

Em 1960 foi descoberta a aflatoxina na Inglaterra, devido ao surto que provocou alta mortalidade em perus, conhecido como “*turkey - X disease*”. Durante a epidemia, milhares de aves morreram após o consumo de torta de amendoim acrescentada na ração, proveniente do Brasil. O principal fungo encontrado no alimento foi o *Aspergillus flavus* (Wogan, 1992). O termo aflatoxina foi formado a partir do nome do seu principal agente produtor (*Aspergillus flavus toxina*).

3.2.1. – Características Físico-Químicas das aflatoxinas

As aflatoxinas são consideradas as micotoxinas de maior importância toxicológica no Brasil dentre as centenas de micotoxinas conhecidas, por apresentarem efeitos carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos. Alguns compostos já foram descritos como sendo aflatoxinas, mas apenas quatro tipos de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ foram relatados como contaminantes naturais de sementes e alimentos. A aflatoxina B₁ geralmente apresenta a maior prevalência em vários produtos agrícolas, e também é a mais tóxica do grupo sendo produzida junto com a B₂ por *A. flavus*, e em quantidades similares o *A. parasiticus* produz as quatro aflatoxinas (Malmann, 2007).

As aflatoxinas são substâncias fluorescentes com características próprias assim como outros compostos heterocíclicos. As aflatoxinas B₁ e B₂ apresentam uma fluorescência azul, e a letra B é derivada da palavra *Blue* enquanto que as aflatoxinas G₁ e G₂ apresentam uma fluorescência verde amarelada sob luz ultravioleta, sendo que a letra G é derivada da palavra

Green (Hussein and Brasel, 2001). As aflatoxinas M₁ e M₂ isoladas no leite, carne e urina são metabólitos das aflatoxinas B₁ e B₂, produzidas pelo fígado após ingestão de alimentos contaminados (Coulombe, 1991).

A estrutura química das aflatoxinas é muito semelhante, sendo que todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bi-furanóide. São compostos químicos simples e de baixo peso molecular. As aflatoxinas do grupo B apresentam anel ciclopentona na molécula, enquanto que as da série G apresentam anel lactona (Hussein and Brasel, 2001). A série B das aflatoxinas é quimicamente diferente da série G pela presença do anel ciclopentenona no lugar de um anel 3-lactona. Nas aflatoxinas B₁ e G₁ são encontradas uma dupla ligação 8,9 na forma de um éter vinil no anel terminal furano, mas não são encontradas nas aflatoxinas B₂ e G₂ (Jaimez et al., 2000). As estruturas químicas das aflatoxinas são semelhantes, mas elas apresentam diferentes graus de atividade biológica. A aflatoxina B₁ é frequentemente encontrada em cereais, e a que apresenta maior toxicidade, seguida pela aflatoxina G₁, B₂ e G₂ (Coulombe, 1991).

As aflatoxinas podem ser classificadas como compostos de natureza cristalina, termoestáveis e bastante solúveis em solventes moderadamente polares, como clorofórmio e metanol, portanto possuem pouca solubilidade em água. São destruídas totalmente na presença de amônia e pelo tratamento por hipoclorito (Salud, 1983). Não há um método totalmente eficaz para a inativação das aflatoxinas, sendo que a eficiência de cada processo depende do tipo de alimento a ser descontaminado, sua atividade de água, os tipos de aflatoxinas nele presentes, o nível de contaminação e o grau de associação em que as aflatoxinas estão ligadas aos constituintes ao alimento, principalmente às proteínas. A decomposição das aflatoxinas ocorre na faixa de temperaturas entre 23,7 – 30,6°C, variando de acordo com a atividade de água, pH do substrato e exposição ao calor. Por outro lado, os raios ultravioletas da luz do sol são muito eficazes na desativação das moléculas de aflatoxinas (Rustom, 1997).

As aflatoxinas apresentam ocorrência no mundo inteiro, sendo que as espécies de *Aspergillus* são capazes de crescer em ampla variedade de substratos e sob diversas condições ambientais. A formação da toxina nos produtos agrícolas ocorre em condições de tempo quente e úmido, e em instalações de armazenagem deficiente ou inadequada, sendo que os fatores mais importantes que influenciam o crescimento e a produção de aflatoxinas são: a umidade relativa, que na maioria dos casos a faixa requerida é de 88 a 95%, e a temperatura, sendo ótima para o crescimento do fungo de 36 a 38°C e para a produção máxima de toxina de 25 a 27°C (Abbas, 2005). Outros fatores que podem ainda influenciar a produção de

aflatoxinas são: composição do substrato, pH, atmosfera (teor de oxigênio e de dióxido de carbono), competição microbiana, danos mecânicos, linhagem do fungo contaminante e estresse da planta (Alonso-Gonzalez et al., 2006).

Esta micotoxina pode contaminar uma grande variedade de alimentos, principalmente o amendoim, nozes, sementes de algodão, milho, trigo, sementes oleosas em geral, ração animal (Northolt, 1997). Principalmente na Índia e América do Sul, o milho e o amendoim continuam sendo as maiores fontes de aflatoxinas, porém outros cereais produzidos em clima tropical bem como seus subprodutos também são susceptíveis à contaminação por aflatoxinas (Moss, 1998). A preocupação relacionada aos impactos negativos das aflatoxinas sobre a saúde levou à investigação de estratégias para prevenir sua formação em alimentos, bem como, para eliminar, inativar ou reduzir a biodisponibilidade destas toxinas em produtos contaminados (Hernandez-Mendoza et al., 2009). Entretanto, só poderemos evitar a contaminação dos produtos melhorando algumas práticas agrícolas, usando agentes antifúngicos adequados, utilizando conhecimentos e aplicações da engenharia genética, além de controlar as adequadas condições de armazenamento dos grãos e cereais, principalmente a temperatura e a umidade (Gonzalez, 2001).

3.2.2. – Legislação

No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos limites máximos em alimentos estão previstos na legislação. A Resolução nº 34 de 1976, antiga CNNPA/MS – Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos estabelece um limite de aflatoxina B1 e G1= 30µg/kg para todos os alimentos exceto amendoim, milho e seus produtos (Sabino, 1996). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) em 15 de outubro de 2002 criou a Resolução RDC nº 274, 2002 que revoga a Resolução nº 34/76, para os alimentos como leite fluído, leite em pó, amendoim, pasta de amendoim, milho em grão, farinha ou sêmola de milho para consumo humano, aprovando o regulamento técnico sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis nestes alimentos (Brasil, 2002).

No Rio Grande do Sul, entre março de 2000 a abril de 2002, 664 amostras de amendoim e seus derivados foram analisadas, e 31,33% estavam contaminadas com aflatoxinas, sendo a maioria proveniente de produtos informais comercializados sem fiscalização sanitária (Mallmann, 2005). No amendoim a ocorrência de aflatoxinas é maior,

devido à afinidade do *Aspergillus flavus* por este alimento e, principalmente, quando as condições de umidade e temperatura são favoráveis ao seu crescimento (Diniz, 2006).

No Brasil, embora a legislação esteja em vigor, à ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, e em elevados níveis, principalmente no Estado de São Paulo, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, como milho, amendoim e derivados (Sabino et al., 1989). A contaminação de derivados de amendoim, como paçocas e outros doces, assume destacada relevância em saúde pública, devido ao fato das crianças constituírem os principais consumidores desses produtos (Almeida F., 1998; Bruno, 2000).

3.2.3. – Metabolismo das aflatoxinas

As aflatoxinas são rapidamente absorvidas pela sua alta lipossolubilidade e são lentamente excretadas. As aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal por difusão passiva, difundindo-se rapidamente por todo o organismo de maneira que três horas após a alimentação, podem encontrar-se as aflatoxinas B₁ e B₂ em todos os tecidos (Mello, 1999; Sharma, 1991), sendo que seu pico máximo é em uma hora (Jubert, C. et al. 2009). Ao ser absorvida a aflatoxina B₁ é imediatamente ligada de forma reversível à albumina e também em menor escala a outras proteínas. As formas ligadas e não ligadas da aflatoxina B₁ a proteínas séricas distribuem-se pelos tecidos, principalmente no fígado (Wyatt, 1991). São biotransformadas primariamente no fígado, por enzimas microssomais do sistema de funções oxidases mistas (CYP), pertencentes à superfamília de enzimas do citocromo P-450 (Biehl, 1987), que constituem parte do processo de detoxificação de uma ampla variedade de xenobióticos no organismo (Forrester et al., 1990). A forma ativa da aflatoxina B₁ é o metabólito 8,9-epóxido de aflatoxina B₁, anteriormente denominado AFB₁ - 2,3 - epóxido, originado através da epoxidação da dupla ligação do éter vinílico, presente na estrutura bifuranóide da molécula de aflatoxina B₁ (Biehl, 1987). Este composto, altamente eletrofílico, é capaz de reagir rapidamente, através de ligações covalentes, com sítios nucleofílicos de macromoléculas, como do ácido desoxirribonucléico (DNA), ácido ribonucléico (RNA) e proteínas. Estas ligações determinam à formação de aductos, os quais são responsáveis pela lesão bioquímica primária produzida pelas aflatoxinas (Oliveira, 1997).

O metabólito 8,9-epóxido da aflatoxina B₁ também pode sofrer uma conjugação enzimática com uma molécula de glutatona reduzida, através de glutatona-S-transferases,

constituindo uma importante via de detoxificação deste composto, podendo ser excretado na urina, bile e fezes (Essigmann et al., 1982). Esta ligação do 8,9-epóxido da aflatoxina com o DNA modifica a sua estrutura e por isso a sua atividade biológica, originando assim os mecanismos básicos dos efeitos mutagênicos e carcinogênicos da aflatoxina B₁. A formação de aductos ocorre através da ligação com guaninas da molécula de DNA, na posição N7, ao nível do códon 249, do gene supressor de tumores p53 (Hsieh and Atkinson, 1991). A ocorrência deste tipo de alteração é característica de vários carcinomas no homem, sobretudo o hepático (Bressac et al., 1991; Harris, 1991; Ozturk, 1991; Puisieux et al., 1991).

Estudos em fígados de ratos demonstraram que os aductos AFB₁- N7-guanina podem ser retirados após a sua formação, deixando sítios apurínicos na molécula de DNA (Hsieh and Atkinson, 1991). Os sítios vagos tendem a ser preenchidos com adenina, resultando em transversão de guanina para timina, o que origina um ponto de mutação bastante significativo (Aguilar et al., 1993). Os aductos de DNA, depois de sofrerem depurinação espontânea, podem ser conjugados e excretados, sobretudo através da urina (Groopman et al., 1992).

A biotransformação da aflatoxina B₁ inclui, além da epoxidação, as reações de hidroxilação e de O-desmetilação. Na reação de hidroxilação são formadas as aflatoxinas M₁ (AFM₁), aflatoxina Q₁ (AFQ₁) e a aflatoxina B_{2a} (AFB_{2a}), enquanto que a aflatoxina P₁ (AFP₁) é formada na reação de O-desmetilação. Esses quatro novos compostos possuem o grupo hidroxila em sua molécula, permitindo a sua conjugação com o ácido glicurônico ou sulfatos, tornando-as substâncias bastante solúveis em água. Essas substâncias podem então ser excretadas através da urina, bile e fezes (Biehl, 1987).

As vias de biotransformação da aflatoxina B₁ mudam entre as espécies animais, tal evento poderia justificar os diferentes graus de susceptibilidade à aflatoxina B₁ entre os indivíduos (Wogan, 1992). Existe atualmente consenso, entre grande número de especialistas, de que a aflatoxina B₁ é, na realidade, um pró-carcinógeno, o qual requer ativação metabólica para manifestar seus efeitos tóxicos (Biehl, 1987; Hsieh and Atkinson, 1991; Wogan, 1992).

Devido às reações ocorridas entre a aflatoxina B₁ e DNA, RNA e proteínas, a transição de enzimas e formação de algumas destas conduz a graves consequências para o organismo por comprometer o metabolismo energético, produção de anticorpos e mobilização de gordura (Beer, 1991). Os efeitos citotóxicos da aflatoxina B₁ ocorrem devido à formação de radicais livres dentro dos hepatócitos resultando na peroxidação dos fosfolipídeos e consequente aumento na permeabilidade das membranas plasmática, mitocondrial, do retículo endoplasmático e dos lisossomos, diminuindo a fluidez, inativando completamente as proteínas de membrana e despolarização da membrana mitocondrial (Bischof, 2007).

3.2.4. – Toxicidade das aflatoxinas

As diferenças intra e interespecies observadas na biotransformação da aflatoxina B₁, particularmente em relação aos mecanismos de bioativação e detoxificação. Por exemplo, a habilidade de ativar a aflatoxina B₁, para a formação do epóxido, é mais eficiente em preparações enzimáticas de fígado de ratos, do que de primatas, incluindo o homem; por outro lado, observa-se o oposto em relação à capacidade de formação de derivados hidrossolúveis e a consequente detoxificação da AFB₁ (Massey et al., 1995).

Foram investigados em cobaias de laboratório os principais efeitos teratogênicos da aflatoxina B₁ e consistiram em número reduzido de nascidos vivos, baixo peso médio dos nascidos vivos, atraso no desenvolvimento físico, alterações de desempenho neurocomportamental e coordenação motora prejudicada (Kihara, 2000). Na literatura há relatos da indução da fenda palatina, malformação do esqueleto e do sistema nervoso central, retardamento do crescimento intra-uterino, carcinogênese transplacentar em ratos e imunossupressão seletiva em embriões de pintos (Wild and Turner, 2002).

Devido à concentração de aflatoxina nos alimentos, o tipo e o tempo de ingestão das aflatoxinas, são observados diferentes sinais e sintomas. A grande maioria dos animais expostos a esta micotoxina mostram sinais da doença que vão de agudos (letais ou não letais), subagudos e crônicos. Os primeiros sinais clínicos se apresentam em poucas horas a uma semana sendo eles: hepatite, hemorragia, nefrite e enterite seguida de morte (Malmann, 2007). Os efeitos subagudos provocam alterações e distúrbios nos órgãos dos animais e dos homens, principalmente no fígado, sendo resultado da ingestão de doses menos elevadas por períodos maiores (Teixeira, 2008). Já, os efeitos crônicos são manifestações decorrentes da ingestão de baixas doses de aflatoxinas por um período prolongado. Na aflatoxicose crônica, o sinal clínico mais evidente é a diminuição da taxa de crescimento dos animais jovens, sendo observados os efeitos de imunossupressão, redução da contagem de linfócitos T, diminuição da produção de imunoglobulinas, diminuição da fagocitose e a diminuição da resistência (Leeson, 1995) Também se pode observar a diminuição da eficiência reprodutiva, piora da conversão alimentar, taxa de crescimento e ganho de peso (Malmann, 2007), sendo que em qualquer um dos casos, o aparecimento dos sintomas e sua gravidade dependem da espécie animal, idade, estado nutricional e do sexo.

Entre as espécies animais a sensibilidade aos efeitos das aflatoxinas é variável. A relação dose-resposta pode variar de acordo com raça, sexo, idade, composição da dieta, entre outros fatores, mesmo entre indivíduos de uma mesma espécie (Coulombe, 1991). Para várias espécies, os machos são mais susceptíveis do que as fêmeas e em geral a sensibilidade é acentuadamente maior nos jovens do que nos adultos (Leeson, 1995). Entretanto, considerando todos estes fatores, o efeito de toxicidade crônico mais importante das aflatoxinas é representado pela carcinogênese hepática em várias espécies animais, (peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas). Nestes animais, mesmo quando ingerida em quantidades muito baixas a aflatoxina B₁ induz à formação de carcinoma hepatocelular, o que permite considerá-la como um dos mais potentes hepatocarcinógenos naturais (Coulombe, 1991). A dose efetiva de AFB₁ ingerida para a indução de tumores hepáticos varia amplamente entre as espécies, de modo similar ao que ocorre em relação à toxicidade aguda. Peixes e aves são extremamente sensíveis, e a dose efetiva para a indução de hepatomas situa-se entre 10 e 30 µg/kg de aflatoxina B₁ na dieta. Contudo, a sensibilidade é particularmente variável entre roedores, sendo que os ratos respondem nos níveis de 15 a 1.000 µg/kg de aflatoxina B₁ na dieta, enquanto que certas cepas de camundongos não apresentam nenhuma resposta em doses de até 150.000 µg/kg de AFB₁ (Wogan, 1992).

Além dos efeitos hepatocarcinogênicos, está comprovada a relação entre a ingestão de aflatoxina B₁ com a incidência da hepatite B e do “*Kwashiorkor*”, que é uma condição causada por uma carência proteica ou de outros nutrientes, cujos sintomas são letargia, retardamento mental, anemia, despigmentação da pele, perda ou descoloração do cabelo, que mata milhões de crianças nos países subdesenvolvidos (Burgueira, 1986; Wong, 1998). Pesquisadores têm sugerido que o desenvolvimento da “*Kwashiorkor*” pode ser resultado da intoxicação aguda por aflatoxinas, e que os efeitos dependem da frequência e da quantidade de ingestão de produtos contaminados com elas (Teixeira, 2008).

3.3. – Estresse Oxidativo e aflatoxinas

3.3.1. – Radicais Livres e Estresse Oxidativo

Radical livre (RL) refere-se a um átomo ou molécula quimicamente muito reativa, com que contenha um ou mais elétrons não pareados no orbital atômico ou moléculas com alto grau de reatividade química que é a causa para o grande número de efeitos prejudiciais ao organismo (Vega, 2002).

Tal configuração eletrônica faz dos RLs moléculas muito instáveis, com meia-vida muito curta, apresentando uma grande capacidade reativa. A presença desses radicais no organismo humano torna crítica à manutenção de muitas funções fisiológicas normais (Pompella, 1997). A fim de captar um elétron para sua estabilização, estes radicais podem reagir com qualquer composto como proteínas, lipídios, açúcares, DNA entre outros, provocando uma reação em cascata que pode culminar em lesão e morte celular (Halliwell, 2007a; Júnior, 1998).

Esses RLs, cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, são classificados como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Barreiros, 2006; Droge, 2002). A geração contínua das EROs é um processo fisiológico característico do ciclo respiratório celular (Sies and Cadenas, 1985). Os organismos obtêm o ATP da redução completa do O_2 na membrana mitocondrial, o qual é reduzido à água. Entretanto o O_2 pode não ser reduzido completamente, originando intermediários altamente reativos e danosos às células como radical superóxido ($O_2\bullet$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($\bullet OH$), sendo esses os principais (Floyd, 1984).

Entre estas formas reativas de oxigênio o radical superóxido apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (Anderson, 1996).

O $O_2\bullet$ é o primeiro intermediário a ser formado a partir da redução incompleta do O_2 molecular para a formação de H_2O (Harris, 1992). A partir deste elemento podem se formar outras espécies ativas de O_2 , como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\bullet OH$) (Esterbauer et al., 1986; Pryor and Castle, 1984). O H_2O_2 em condições fisiológicas é formado na mitocôndria em função da atividade metabólica (Chance, 1979) sendo gerado a partir do superóxido por meio de dismutação, conseqüentemente esta reação é catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD) (Pal Yu, 1994). Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxila, que é o mais reativo dos intermediários, pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e, assim, influenciar enzimas, membrana ou ácido nucléicos (Heunks, 1999). O radical hidroxila tem meia vida-longa, sendo

capaz de atravessar as camadas lipídicas e reagir com as membranas eritrocitárias devido à sua elevada difusibilidade, (Cimen, 2008; Valko et al., 2006), podendo ter sua toxicidade aumentada de 10 para 1000 vezes na presença de ferro (Reação de Fenton, gerando $\bullet\text{OH}$) (Halliwell, 2007b). Um alvo importante das EROs são as membranas fosfolipídicas que causam reações de oxidação em cadeia, aumentando a permeabilidade a íons, promovendo inativação de receptores de membrana e a produção de metabólitos tóxicos (MacNee, 2001). O processo de peroxidação lipídica está ligado a uma série de processos patológicos envolvendo EROs (Middleton et al., 2000; Nordberg and Arner, 2001).

Em condições normais, os radicais livres são continuamente produzidos e neutralizados pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. Porém, quando estes radicais livres são produzidos em altas quantidades, ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, eles podem causar dano celular, representando um mecanismo fundamental para as doenças ou efeitos nocivos em seres humanos, denominado “estresse oxidativo” (Halliwell, 1999).

Em sistemas aeróbios faz-se essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 e também em situações não fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos como a AFB1, que provocam a redução incompleta do O_2 (Ross D, 1991).

3.3.2. – Estresse oxidativo e sistema nervoso central

O cérebro é um dos principais órgãos que gera grandes quantidades de EROs. Em comparação com outros órgãos, o cérebro é especialmente vulnerável ao estresse oxidativo devido à baixa atividade das enzimas antioxidantes e altas quantidades de lipídios com ácidos graxos insaturados, que são alvos da peroxidação lipídica (Milder and Patel, 2012).

O cérebro obtém quase toda a sua energia a partir da fosforilação oxidativa mitocondrial, que produz ATP ao mesmo tempo em que reduz o O_2 molecular a H_2O . Em determinadas condições, espécies altamente reativas, como os radicais livres de oxigênio e hidroxila, e o H_2O_2 podem ser gerados como produtos colaterais desse processo (Gupta et al., 2001). O excesso de ferro depositado no cérebro e alterações no metabolismo do ferro pode também contribuir no desenvolvimento de muitas doenças (Dal-Pizzol et al., 2000).

Portanto, o metabolismo de alguns dos principais neurotransmissores, como a dopamina, gera EROs capazes de consumir as defesas antioxidantes, que são baixas em muitas regiões do cérebro (Gilgun-Sherki et al., 2002). Sob condições normais, o cérebro pode equilibrar o excesso de EROs gerado com a suas próprias defesas antioxidantes.

Doenças frequentes na velhice e já consagradas como consequentes ao estresse oxidativo são a doença de Parkinson, o acidente vascular cerebral, a doença de Alzheimer, a esclerose múltipla e catarata (Nohl, 1993). O cérebro é reconhecidamente susceptível ao dano oxidativo em função da alta utilização de oxigênio (atividade mitocondrial) e dos altos níveis de lipídios não saturados e metais de transição, como o ferro (Shigenaga et al., 1994). Além disso, espécies reativas e peroxidação lipídica têm sido implicadas na patogênese de distúrbios neurológicos, incluindo trauma cerebral, isquemia e doenças neurodegenerativas. As hipóteses mais aceitas envolvem genética de grupo familiar e deficiência na atividade mitocondrial (Halliwell, 1992; Halliwell, 1994).

3.3.3. – Defesas enzimáticas

Os sistemas biológicos são protegidos dos danos provocados por espécies reativas de oxigênio basicamente através de três etapas: prevenção (proteção contra a formação de ERO); interceptação (através do sistema antioxidante enzimático e não enzimático, que interceptam as ERO e impedem as continuações de reação em cadeia) e reparo (sistema que atuam quando há ocorrência de algum dano) (Picada J.N., 2003). As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase (GPx) e a catalase, que evitam o acúmulo de H_2O_2 e de $O_2\cdot$, e a consequente produção de radicais $\cdot OH$, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático específico de defesa. As defesas não-enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutaciona e ascorbato, além da albumina sérica, do ácido úrico e do ácido dehidroascórbico (Halliwell, 1999).

Vários estudos mostram a participação do estresse oxidativo nos efeitos tóxicos induzidos pela aflatoxina B_1 , e atribuem a este fato a hepatotoxicidade característica induzida por esta micotoxina. Sugere-se que os efeitos tóxicos são mediados pelo aumento da produção de espécies reativas como o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio durante o metabolismo hepático da micotoxina (Towner et al., 2003).

El – Nekeety et al. (2011), mostrou que o consumo de dieta contendo aflatoxina (2,5 mg/kg, 29 dias) por ratos Sprague – Dawley (100-120 g) aumentou os níveis de AST (Aspartato Aminotransferase), ALT (Alanina Aminotransferase), fosfatase alcalina (FAL), colesterol, triglicerídeos, lipídeos totais, creatinina, ácido úrico e óxido nítrico e reduziu os níveis da TAC (capacidade antioxidante total), sendo que nos tecidos hepático e renal aumentou os níveis de MDA (malondialdeído). O tratamento dos animais com o antioxidante *Thymus vulgaris* mostrou hepatoproteção, melhorando todos os parâmetros analisados (El-Nekeety et al., 2011).

Já Verma and Mathuria usaram em seu experimento camundongos Swiss albinos machos (37-40g) que receberam a administração de aflatoxina por 45 dias, mostrando aumento dos níveis de MDA e redução da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e bem como do conteúdo de ácido ascórbico (vitamina C) nos tecidos hepático e renal. Além disso, o antioxidante curcumina protegeu dos efeitos causados pela aflatoxina (Verma and Mathuria, 2008). O mesmo antioxidante (curcumina) também apresentou efeitos hepáticos benéficos no trabalho de Dimas S. El-Agamy (2010), que também utilizou o resveratrol como antioxidante, mas este não reverteu o dano causado pela aflatoxina B₁. A administração por 90 dias de aflatoxina B₁ (25 µ/kg) em ratos machos Fischer albinos, aumentou os níveis plasmáticos da AST, ALT e γ-GT (gamma-glutamyl transaminase), juntamente com a redução da atividade de enzimas antioxidantes SOD, catalase e GPx, e aumento dos níveis de peroxidação lipídica no fígado dos animais.

Da mesma forma, Ravinayagam V. et al. (2012) mostrou que a administração de aflatoxina B₁ (2 mg/kg, i.p., 45 dias) aumentou os níveis malondialdeído, peroxidação lipídica e proteínas carbonil no fígado e nos rins, e reduziu a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, bem como os níveis de glutathione, grupos tióis e vitamina E e C, e o antioxidante Tridham (300 mg/kg por v.o.) reverteu estas alterações.

Além disso, a administração de aflatoxina B₁ (450 µg/kg, i.p./ 6 semanas) duas vezes por semana à ratos Wistar machos reduziu a atividade das enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR) e aumentou os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico no fígado e, a administração de clorofila e leite fermentado com probióticos normalizou as atividades enzimáticas e os níveis de peroxidação lipídica (Kumar et al., 2012).

O efeito antioxidante da *Urtica Dioica L.* (2 mL/kg, por v.o./90 dias) em ratos Sprague-Dawley (250 a 300g) foi evidenciado após a administração de aflatoxina B₁ (25

µg/kg, por v.o./90 dias) no fígado, rins e eritrócitos. O antioxidante reverteu a redução da atividade das enzimas GR, CAT, SOD e GST, e o aumento do malondialdeído (MDA), AST, ALT e γ -GT (Yener et al., 2009). No mesmo estudo, também foram investigados os efeitos da AFB₁ no cérebro dos animais, onde houve redução da atividade das enzimas antioxidantes e reversão com o uso da planta, mostrando efeito neurotóxico da AFB₁ e neuroprotetor da *Urtica Dioica L.* O possível efeito neurotóxico da AFB₁ também foi sugerido por Kambur M., et al., (2011), que demonstrou que houve um aumento nos níveis de malondialdeído e da atividade da catalase em cérebro, justificando este aumento pela indução do sistema de defesa antioxidante resultando em aumento da síntese enzimática para a eliminação dos radicais livres induzidos pela exposição a toxina (Barja, 2004).

Os resultados obtidos utilizando machos também são observados quando se pesquisam os efeitos da administração de aflatoxina em fêmeas. Fêmeas Sprague Dawley (100-120 g) administradas com aflatoxina B₁ (3 mg/kg, v.o./29 dias) apresentaram aumento dos níveis da AST, ALT, FAL, colesterol, triglicerídeos, lipídios totais, ácido úrico e creatinina, e dos níveis de peroxidação lipídica no fígado e rim, bem como uma redução da capacidade antioxidante total (TAC). E, de forma semelhante, a adição dos antioxidantes *Lactobacilos casei* e *Lactobacilos reuteri* mostram uma melhora nos níveis destes marcadores (Hathout et al., 2011).

Assim, a partir de um balanço entre as defesas antioxidantes e os efeitos tóxicos das EROs a biomoléculas, os seres vivos conseguem manter o metabolismo e o funcionamento celular inalterados. Porém, em situações específicas, este panorama pode ser comprometido através do excesso de produção de EROs, falha das defesas antioxidantes, gerando estresse oxidativo. Trabalhos mostram que a aflatoxina B₁ induz a um quadro de estresse oxidativo, entretanto como os estudos utilizam diferentes espécies, sexos, tecidos e diferentes esquemas de intoxicação, portanto, torna-se importante a caracterização dos efeitos sobre parâmetros de estresse oxidativo resultantes da exposição aguda à aflatoxina B₁.

3.4. – Neurotoxicidade e aflatoxina

Considerando que existem poucos estudos que investigam os efeitos da AFB₁ sobre o sistema nervoso central, há a necessidade de se estudar se ela interfere na neurotransmissão e/ou com algum sistema de neurotransmissores/receptores específico. Neste sentido, sabe-se

que esta micotoxina causa uma alteração no metabolismo do triptofano no cérebro, o que diminui as concentrações de serotonina (Kimbrough et al., 1992). Assim como, tem-se mostrado que injeções repetidas de aflatoxina B₁ (16 µg/kg i.p./6 semanas) em ratos aumenta no sistema nervoso central e periférico a atividade de Na⁺, K⁺-ATPase, de β-glucuronidase, e β-galactosidase, e diminui a atividade de Mg²⁺-ATPase (Ikegwuonu, 1983).

Além disso, também foi observado que além da diminuição dos níveis de serotonina em ratos Sprague-Dawley (285 a 332g) expostos à aflatoxina via oral duas vezes por semana durante três semanas, com uma dose baixa de 32.8 µg/kg, ou com uma dose alta de 327.9 µg/kg. Após 3 dias da última dose administrada foram retirados os órgãos da região cerebral para análise, onde foi apontada uma redução dos neurotransmissores norepinefrina (NE) e dopamina (DA). Foi demonstrado que a aflatoxina B₁ reduziu em 37% a dopamina estriatal e 29% a serotonina, além disso, essa redução também foi observada nos metabólitos da dopamina, (ácido homovanílico (HVA) e ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC)).

As concentrações destes neurotransmissores e metabólitos foram pouco alteradas no córtex cerebral, cerebelo, hipotálamo e medula oblonga. Por isso parece que o maior efeito da aflatoxina é sobre vias dopaminérgicas, podendo perturbar a seletividade da conversão da tirosina para catecolaminas (Coulombe and Sharma, 1985). Desta forma, estas alterações nos níveis dos neurotransmissores podem acarretar alterações no comportamento dos animais, que podem ser imperceptíveis se não forem bem avaliadas.

Neste contexto, considerando que a exposição à aflatoxina altera os níveis dos neurotransmissores serotonina, norepinefrina e dopamina, e, considerando as importantes funções fisiológicas e comportamentais que estes neurotransmissores possuem, torna-se relevante o estudo das possíveis alterações eletrográficas observadas após a exposição a AFB₁ em ratos.

3.5. – Na⁺,K⁺-ATPase

Na⁺, K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9) é uma proteína de membrana plasmática que está presente em virtualmente todas as células eucarióticas e possui um papel crucial na manutenção da homeostase iônica celular (Skou and Esmann, 1992). Em 1941 as primeiras

evidências da presença de uma bomba capaz de translocar Na^+ e K^+ através da membrana celular foram introduzidas por Dean (Dean, 1941).

Skou sugeriu em 1957, uma proteína de membrana com propriedades catalíticas (uma ATPase) capaz de realizar o transporte ativo de sódio e potássio contra seus gradientes de concentração, utilizando a adenosina trifosfato (ATP) como fonte de energia (Skou, 1957). A brilhante descoberta da enzima Na^+, K^+ -ATPase e de seu papel vital na manutenção da viabilidade celular culminou com a condecoração através do Prêmio Nobel em Química, em 1997, entregue a Jens C. Skou.

Usando a energia proveniente da hidrólise do ATP a Na^+, K^+ -ATPase catalisa o transporte de 3 íons Na^+ para o meio extracelular e de 2 íons K^+ para o meio intracelular, sendo esta sua reação básica (Skou and Esmann, 1992). Esse transporte é de grande importância, consome cerca de 40-60% do ATP cerebral para manter o gradiente eletroquímico necessário à excitabilidade neuronal, regulação do volume celular, balanço osmótico e para o transporte de moléculas ligadas ao co-transporte de Na^+ ; como glicose, aminoácidos e neurotransmissores (Aperia, 2007; Erecinska et al., 2004; Jorgensen et al., 2003; Kaplan, 2002). Além das funções básicas, a Na^+, K^+ -ATPase está envolvida em muitas funções de tecidos especializados, como o transporte de Na^+ trans-epitelial e a excitabilidade neuronal e muscular (Li et al., 2004).

3.5.1. – Estrutura da Na^+, K^+ -ATPase

A Na^+, K^+ -ATPase é um complexo enzimático formado por duas subunidades catalíticas principais (α e β), associadas covalentemente e incorporadas no interior da bicamada lipídica (Aperia, 2007; Crambert et al., 2000).

A subunidade α é formada de aproximadamente 1000 aminoácidos, com peso molecular aproximadamente de 110 kDa (Jorgensen et al., 2003; Kaplan, 2002). Quatro isoformas foram descritas da subunidade α , são elas: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ e $\alpha 4$, que atuam em diferentes tecidos, sendo a $\alpha 3$ encontrada no cérebro (Blanco et al., 2000; Dostanic-Larson, 2006; Habiba, 2000). Nessa subunidade encontram-se os sítios de ligação de ATP, íons e ouabaína, e ela é responsável pelas propriedades catalíticas e de transporte da enzima (Blanco and Mercer, 1998).

A subunidade β apresenta aproximadamente 370 aminoácidos e seu peso molecular aproximado de 55 kDa (Jorgensen et al., 2003; Kaplan, 2002). Já foram descritas quatro isoformas, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ e $\beta 4$ (Kaplan, 2002). Essa subunidade parece estar intimamente ligada à estrutura, já que a subunidade α perde sua atividade ao ser separada da subunidade β . Além disso, ela está ligada à afinidade dos íons pela enzima (Blanco et al., 2000; Geering, 2001). A sensibilidade da Na^+, K^+ -ATPase aos íons Na^+ e K^+ é dependente da isoforma da subunidade β , devido a sua interferência na ativação enzimática desencadeada pela presença extracelular do íon K^+ (Lopina, 2001).

3.5.2. – Mecanismo de regulação

Múltiplos mecanismos podem regular a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, influenciando os papéis funcionais da enzima em diferentes condições e tornando-a mais vulnerável a doenças neurodegenerativas. Esses mecanismos reguladores também tornam a enzima alvo potencial para tratamentos terapêuticos (Mallick, 2010).

O mecanismo de ação da Na^+, K^+ -ATPase ocorre inicialmente pela ligação de três íons sódio na porção intracelular da enzima, quando ocorre uma mudança conformacional da enzima que é fosforilada. Os sítios de ligação de Na^+ ficam expostos ao meio extracelular e são liberados. Após o bombeamento dos três íons Na^+ para fora da célula, dois íons K^+ ligam-se em sítios específicos da enzima e o fosfato é liberado mudando novamente a conformação e liberando o K^+ ligado para o meio intracelular. A Na^+, K^+ -ATPase apresenta duas formas conformacionais: uma desfosforilada, com alta afinidade pelo Na^+ e baixa pelo K^+ e outra fosforilada, com alta afinidade pelo K^+ e baixa por Na^+ (Devlin, 2007; Jorgensen et al., 2003; Kaplan, 2002).

Além de sua dependência em ATP, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase é regulada pelo estado de fosforilação e por substâncias endógenas. A atividade da Na^+, K^+ -ATPase é inibida pela ouabaína, que tem um sítio de ligação na face extracelular da enzima. Os níveis de ouabaína são modulados em várias doenças fisiopatológicas. Além disso, a enzima é estimulada por vários neurotransmissores, por exemplo, noradrenalina, adrenalina, dopamina e por hormônios como a insulina (Mallick, 2010).

3.5.3 – Aspectos Fisiológicos e Patológicos da Na^+, K^+ -ATPase no cérebro

A Na^+, K^+ -ATPase está presente em praticamente todas as células, incluindo os músculos esquelético e cardíaco e em alta concentração nas membranas celulares do cérebro (Aperia, 2007) e sua atividade é crucial para o desenvolvimento e função cerebral. Esta enzima é a mais abundante no cérebro, consumindo cerca de 40-50% do ATP gerado, contribuindo de maneira crucial para a manutenção dos gradientes eletroquímicos de Na^+ e K^+ que são de fundamental importância para a manutenção da excitabilidade neuronal e da condução do potencial de repouso, e para sistemas de transporte secundário envolvidos na captação e liberação sináptica de neurotransmissores e regulação do volume celular, pH e concentrações de cálcio (Ca^{2+}) (Benarroch, 2011; Crema et al., 2010). Portanto, mudanças na atividade da Na^+, K^+ -ATPase afetam diretamente a sinalização celular via neurotransmissores e a atividade neuronal, ocasionando aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (Grisar et al., 1992; Moseley et al., 2007).

Estudos sugerem que a inibição da Na^+, K^+ -ATPase é encontrada em várias condições neuropatológicas, incluindo isquemia cerebral, epilepsia e doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Esclerose Múltipla e doença de Parkinson (Benarroch, 2011; Crema et al., 2010; Ferreira et al., 2011). Além disso, o estresse oxidativo pode modular a atividade da Na^+, K^+ -ATPase, sendo que as EROs modificam a composição lipídica da membrana plasmática (Jamme et al., 1995), induzem a carbonilação de proteínas (Dean et al., 1997), e assim aumentam a susceptibilidade à proteólise e comprometimento da funcionalidade da proteína. Além disso, tem sido sugerido que a Na^+, K^+ -ATPase desempenha um papel em vários distúrbios neurológicos, (Aperia, 2007; Benarroch, 2011). A ouabaína, o inibidor da Na^+, K^+ -ATPase, aumenta a entrada de Ca^{2+} em fatias cérebro de ratos (Fujisawa et al., 1965), provoca convulsões eletrográficas registradas em camundongos (Jamme et al., 1995), liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (Li and Stys, 2001) e morte celular no hipocampo de ratos (Lees et al., 1990). Sendo assim, a supressão da atividade genética Na^+, K^+ -ATPase prejudica a aprendizagem espacial e aumenta o comportamento relacionado à ansiedade (Moseley et al., 2007). Bem como é de notar que a diminuição da atividade de Na^+, K^+ -ATPase foi encontrada no *pós-mortem* de cérebro humano epilético

(Grisar et al., 1992) e uma mutação no gene da subunidade α Na^+, K^+ -ATPase tem sido associada com epilepsia em seres humanos (Jurkat-Rott et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que o grau de inibição de Na^+, K^+ -ATPase induzido pela injeção intraperitoneal de PTZ, se correlaciona positivamente com a duração das convulsões induzidas por este agente (Figuera, 2006; Souza, 2009).

A prolongada excitação dos neurônios durante as convulsões pode levar a injúria e morte celular, resultante de mecanismos bioquímicos desconhecidos e que não são bem entendidos. Um aceitável mecanismo de injúria celular envolve a formação de uma quantidade excessiva de radicais livres (Floyd, 1990; Reiter et al., 1997) levando a estresse oxidativo, alterações estruturais em proteínas celulares, membranas lipídicas, DNA e RNA (Benzi and Moretti, 1995). O estresse oxidativo contribuiu em grande parte na morte de células neuronais e gliais em modelos epiléticos em roedores (Arnaiz, 1998).

O cérebro é um alvo preferencial do processo peroxidativo, pois apresenta uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados. Pesquisas sugerem que o aumento na quantidade de radicais e/ou a diminuição na atividade das defesas antioxidantes podem ser reportados durante os processos convulsivos (Berg et al., 1995; Naffah-Mazzacoratti, 2001). Estudos relacionam a administração intraestriatal de metilmalonato à indução de convulsões, formação de espécies oxidativas e inibição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase em estriado de ratos (Figuera, 2003; Figuera, 1999; Marisco, 2003; Mello, 1996; Royes, 2005; Wyse, 2000).

Alguns trabalhos demonstram um aumento em diversos marcadores de espécies reativas, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Bashkatova, 2003; Patsoukis, 2004) e proteína carbonila (Oliveira, 2004; Patsoukis, 2004), assim como uma redução na atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (Oliveira, 2004) em modelos de convulsão induzidos por PTZ, o que sugere que a geração de EROs e ERNs estariam relacionadas com os efeitos convulsivantes e neurotóxicos do PTZ (Bashkatova, 2003). Do mesmo modo, o tratamento com antioxidantes foi capaz de atenuar as convulsões induzidas por esse composto e/ou o dano induzido pelas espécies reativas (Bashkatova, 2003; Kabuto, 1998), o que enfatiza a relação da geração de estresse oxidativo e redução da Na^+, K^+ -ATPase ao aparecimento de convulsões.

Neste sentido, o objetivo geral deste trabalho foi verificar a influência da AFB1 em facilitar as convulsões induzidas por uma dose subconvulsivante de PTZ, e investigar seus efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central pela determinação da atividade da Na^+, K^+ -ATPase e parâmetros de estresse oxidativo após exposição aguda à micotoxina em ratos.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Effect of aflatoxin B1 on seizures induced by a subconvulsant dose of pentilenetetrazol in rats

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

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

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

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

*Corresponding author: Profa. Dra. Ana Flávia Furian

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos,
Universidade Federal de Santa Maria
Prédio 43, Sala 4217
97105-900 Santa Maria, RS, [BRASIL](#).
PHONE: +55 55 3220 8254
E-mail: furian.anaflavia@gmail.com

Abstract

Aflatoxins are produced mainly by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. Aflatoxin B1 (AFB1) is the most common and highly toxic mycotoxin and has been detected in cultures of great importance in the world. AFB1 exerts its effects after conversion into 8,9-epoxide, which reacts with proteins, RNA and DNA. Furthermore, AFB1 could increase ROS levels, alter neurobehavioral performance, damage to motor coordination, and decreased protein levels. It is known that the activity of the enzyme Na⁺,K⁺-ATPase is very important in the brain and a decrease in the activity of this enzyme can result in increased neuronal excitability as facilitating seizures. Thus, the aim of this study was to investigate the influence of AFB1 in facilitating seizures induced by a subconvulsant dose of pentylenetetrazol (PTZ), and evaluate its toxic effects on the brain, by determining the activity of Na⁺, K⁺-ATPase and oxidative stress parameters. EEG recording was performed after acute oral administration of AFB1 (250 mg/kg, p.o.) followed by a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg, i.p.). AFB1 reduced the latency for myoclonus, did not alter total amplitude of the brain waves, and concomitant exposure to PTZ reduced the activity total, $\alpha 1$ and $\alpha 2/\alpha 3$ of the enzyme Na⁺, K⁺-ATPase in the cerebral cortex. In the hippocampus, the AFB1 and PTZ reduced total and $\alpha 2/\alpha 3$ activity of the Na⁺, K⁺-ATPase. AFB1 not alter the activity of catalase (CAT), and glutathione-S-transferase (GST) in the cerebral cortex of animals. We

conclude that AFB1 exerts neurotoxic effect, facilitating seizures induced by PTZ and reducing the activity of the Na⁺, K⁺-ATPase.

Key-words: Aflatoxin B1; Na⁺,K⁺-ATPase; oxidative stress; neurotoxicity; seizures; pentilenetetrazol

Introduction

Aflatoxins are biologically active secondary metabolites mostly produced by certain species of *Aspergillus* molds (Bedard and Massey 2006), mainly produced by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, and *A. nomius*. Other fungi known to produce aflatoxins are *A. bombycis*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, and *A. pseudotamarii* (Varga 2009; Coppock 2012). There are many natural aflatoxins such as aflatoxin B1, B2, G1, and G2, among which aflatoxin B1 (AFB1) is the most frequently occurring and highly toxic one (Wogan, Edwards et al. 1971; Abdel-Wahhab, Nada et al. 1998). The contamination of foods by aflatoxin remains a significant public health problem worldwide, particularly in the developing world where aflatoxin exposure has been reported to be associated with approximately 40% of all disease burden (Williams, Phillips et al. 2004).

General population is exposed to aflatoxin primarily by consuming contaminated foods such as spices, cereal grains, oil seeds, corn and corn products, cottonseed, peanuts and peanut products, tree nuts, fermented beverages made from grains, milk, cheese, meat, nuts, and fruit juices might be contaminated with aflatoxins (Bullerman 1986). Contamination is higher on crops grown in hot, humid and tropical climates generally, but also can occur in temperate climates varying from year to year (IARC 1976; Program 2011). Consequently, aflatoxins can invade the food supply at any time during production, processing, transport, and storage. Evidence of acute aflatoxicosis in humans has been reported primarily in developing countries lacking the resources to effectively screen aflatoxin contamination from the food supply (Simjee, S. 2007). Reported mortality rates in the acute phase of aflatoxicosis range from 10 to 60% (Chao, Maxwell et al. 1991; Peraica, Radic et al. 1999). It has been estimated that aflatoxins, through food and polluted air, negatively impact up to 5 billion people who live in warm and humid climates (Williams, Phillips et al. 2004).

AFB1 is metabolized in the liver by the cytochrome P450 system to the highly reactive AFB1-8,9-epoxide, which is responsible for the toxicity (Garner 1979; Williams, Phillips et

al. 2004). The 8,9-epoxide metabolite can be detoxified through conjugation with glutathione, a reaction mediated by the enzyme glutathione S-transferase.

Aspergillus group of fungi have a wide range of biological activities like acute toxicity, teratogenicity, mutagenicity and carcinogenicity (Eaton 1994; Abdel-Wahhab, Nada et al. 1999; Abdel-Wahhab, Ahmed et al. 2006; Abdel-Wahhab, Omara et al. 2007; Abdel-Wahhab, Hassan et al. 2010). AFB1 is classified by the International Agency of Research on Cancer as Group 1 human carcinogen (IARC 1993). In humans, acute aflatoxicosis is manifested by vomiting, abdominal pain, pulmonary edema, coma, convulsions, and death with cerebral edema and fatty involvement of the liver, kidney, and heart, this being the only human study investigating the acute effect of aflatoxins (Strosnider, Azziz-Baumgartner et al. 2006). The occurrence of acute aflatoxicosis was evidenced by the severe outbreak in Kenya in 2004 (Probst 2007). The metabolic effects of aflatoxin includes inhibition of DNA, RNA and protein synthesis (Bushby 1981). Reports which suggest that AFB1 is a potential etiological agent of reye's syndrome, a disease characterized by cerebral edema and neuronal degeneration in adolescent children (Ryan, Hogan et al. 1979; Nelson 1980). Studies indicated that AFB1 alters specific peripheral and central nervous system neuronal ATPase (Ikegwuonu 1983) and reduces whole brain tryptophan hydrolase in rats (Weekley and Llewellyn 1984). AFB1 was also shown to significantly alter whole-brain serotonin (5-HT) values in chickens (Ahmed and Singh 1984).

Moreover, one of manifestations of AFB1-induced toxicity is oxidative stress (Souza, Tome et al. 1999). Oxidative stress occurs when the generation of reactive oxygen species (ROS), overpowers the system's ability to neutralize and eliminate them. ROS are free radicals of reactive anions formed by the incomplete one-electron reduction of oxygen including superoxide anion (O_2^\bullet), hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radical ($\bullet OH$) (C. 1999). Increased levels of ROS usually results from lack or functional disturbance in antioxidant molecules or due to overproduction of EROs from the surrounding environment (Sohal and Weindruch 1996). Several studies show the involvement of oxidative stress in the toxicity induced by AFB1, and attribute this to the characteristic hepatotoxicity induced by this mycotoxin. It is suggested that toxic effects are mediated by increased production of reactive species such as O_2^\bullet the $\bullet OH$ and the H_2O_2 during the hepatic metabolism of mycotoxin (Towner, Qian et al. 2003).

In addition, oxidative stress could modulate the activity of Na^+ , K^+ - ATPase, since ROS modifies the lipid composition of plasma membrane (Jamme, Petit et al. 1995), induces protein carbonylation (Dean, Fu et al. 1997) and so increases susceptibility to proteolysis and

impairment of protein functionality. The Na^+, K^+ -ATPase is an ubiquitous membrane-spanning enzyme, which catalyzes the transport of sodium and potassium across the plasma membrane of mammalian cells coupled to the hydrolysis of ATP. The enzyme comprised a catalytic α subunit and a smaller glycosylated β subunit (Mercer, R. W. et al. 1993). In the brain consumes about 50% or more ATP (Erecinska and Silver 1994), contributing crucially to the maintenance of the electrochemical gradients of Na^+ and K^+ which are of fundamental importance for the maintenance of neuronal excitability and conduct of the resting potential, and for secondary transport systems involved in the uptake and release of neurotransmitters and synaptic regulation of cell pH and volume concentrations of calcium (Ca^{2+}) (Crema, Schlabitz et al. 2010; Benarroch 2011). Therefore, changes in the Na^+, K^+ -ATPase directly affect cell signaling via neurotransmitters and neuronal activity, causing an increase or decrease in neuronal excitability, depending on the degree of inhibition induced, neuronal type and activity affected (Grisar, Guillaume et al. 1992; Moseley, Williams et al. 2007).

Furthermore, it has been suggested that the Na^+, K^+ -ATPase plays a role in several neurological disorders (Aperia 2007; Benarroch 2011). The ouabain inhibitor of Na^+, K^+ -ATPase increases Ca^{2+} entry in rat brain slices (Fujisawa, Kajikawa et al. 1965), causes electrographically recorded seizures in mice (Jamme, Petit et al. 1995), glutamate release by reversal of Na^+ -dependent transporter (Li and Stys 2001) and cell death in rat hippocampus (Lees, Lehmann et al. 1990). Furthermore, genetic suppression of Na^+, K^+ -ATPase activity impairs spatial learning and increases anxiety-related behavior (Moseley, Williams et al. 2007). The same way decreased Na^+, K^+ -ATPase activity has been found in the post-mortem epileptic human brain (Grisar, Guillaume et al. 1992) and a mutation in the Na^+, K^+ -ATPase α subunit gene has been associated with epilepsy in humans (Jurkat-Rott, Freilinger et al. 2004).

Therefore in the present study, we have investigated the effects of AFB1 in facilitates the convulsions induced by a subconvulsive dose of PTZ, and investigate its toxic effects on brain by the measuring Na^+, K^+ -ATPase activity and oxidative stress parameters after acute exposure to mycotoxin in rats.

Materials and methods

Animals and reagents

Young male Wistar rats (70–100 g) were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to water and food (Supra; Santa Maria, RS, Brazil). All experimental protocols were designed with the goal of keeping the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These protocols were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (Process 0048/2013). Aflatoxin B1 (Cas. No. 1162-65-8; ≥ 95 % purity) was obtained from Sigma (St. Louis, Missouri, USA). A stock solution of AFB1 was prepared dissolving it in DMSO 0.02 %.

Electroencephalographic (EEG) surgical procedures

Animals were anesthetized with ketamine (80mg/kg; *i.p.*) and xilazine (10 mg/kg; *i.p.*) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotactic guidance, two stainless steel screw electrodes were placed over the parietal cortex, along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to a multipin socket and were fixed to the skull with dental acrylic cement. Chloramphenicol (200 mg/kg, *i.p.*) was administered immediately before the surgical procedure. After surgery and for 2 days all rats received a subcutaneous injection of 0.01 mg/kg buprenorphine hydrochloride for amelioration of pain. Experiments were performed 3 days after surgery.

Experimental design

After surgery with 3 days intervals, twenty four rats were divided into four groups for acute treatment with single-dose of:

- Group I. Control group (DMSO 0.02%, v.o., and NaCl 0,9% i.p.);
- Group II. PTZ (DMSO 0.02%, v.o., and PTZ 30 mg/kg i.p.);
- Group III. AFB1 (aflatoxin B1, 250 µg/kg v.o., and NaCl 0.9% i.p.);
- Group IV. AFB1-PTZ (aflatoxin B1 250 µg/kg v.o., and PTZ 30 mg/kg i.p.).

AFB1 (250 µg/kg, v.o.) was given orally, and electroencephalographic activity was recorded for 1 hour, then PTZ (30 mg/kg, i.p.) was administrated and recorded for another 15 minutes. Immediately after EEG, animals were killed by decapitation and cerebral cortex and hippocampus tissues were quickly removed for biochemical analysis, as described further below.

EEG recordings

The procedures for EEG recording and injection of drugs were carried out as previously described. To perform the procedures the animals were placed in an acrylic glass cage (25 x 25 x 40 cm) and habituated for 15 min before EEG recording. The rat was then connected to a 100x headstage pre-amplifier (model #8202-DSE3) in a low-torque swivel (Pinnacle Technology Inc, Lawrence, KS, USA) and the EEG was recorded using a PowerLab 16/30 data acquisition system (AD Instruments, Castle Hill, Australia).

Routinely, a 15 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After was administered a dose of 250 µg/kg orally of AFB1 and observed the electroencephalographic activity for one hour. After this period, was injected a dose of PTZ (30 mg/kg, i.p.) and observed for 15 minutes to verify the latency of clonic seizures and generalized tonic-clonic seizures, concomitant with the completion of the electroencephalogram. EEG signals were amplified, filtered (1 Hz, highpass), digitalized (sampling rate 1024 Hz) and stored in a PC for off-line analysis. EEG recordings were analyzed off-line using LabChart 7.2 software (AD Instruments) (McColl, Horne et al. 2003). Wave amplitude was automatically calculated using the native LabChart functions Event count and Average cyclic height, respectively. To electroencephalographic wave's amplitude determination only EEG register of the animals which doesn't present generalized seizure were used.

Na⁺,K⁺-ATPase activity measurements

The cerebral cortex and hippocampus was homogenized in ice-cold 30mM Tris– HCl buffer. Na⁺,K⁺-ATPase activity was measured according to Wyse et al.(Wyss and Kaddurah-Daouk 2000). Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl₂ and 50 μg of protein in the presence or absence of ouabain, in a final volume of 350 μL. The reaction was started by the addition of adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by the addition of 70 μL of 50% (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations were used and the reaction was linear with protein and time. Appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Pi) released was quantified by the colorimetric method described by Fiske and Subbarow (Fiske and Subbarow 1925), using KH₂PO₄ as reference standard. Specific Na⁺,K⁺-ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain) and expressed in nmol Pi/mg protein/min.

We also investigated whether some Na⁺, K⁺-ATPase α isoforms are selectively modulated by AFB1. For this purpose, we used a classical pharmacological approach based on the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi, Snyder et al. 1999). We determined whether AFB1 inhibited ouabain-sensitive ATPase activity using 3 μM (that inhibit Na⁺, K⁺-ATPase isoforms containing α₂ and α₃ subunits) or 4mM ouabain (that inhibits all isoforms).

Catalase (CAT) activity

CAT activity was determined by following the decomposition of 30 mM hydrogen peroxide in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) at 240 nm for 120 s in a thermostated (37° C) spectrophotometer, according to the method proposed by Aebi (Aebi 1984). CAT specific activity was expressed as first-order rate constant k, per mg of protein.

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

Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm, at 30°C by the method of Habig, Pabst (Habig, Pabst et al. 1974). The reaction mixture contained an aliquot of supernatant of sample, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB/min/mg of protein.

Protein determination

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

Statistical analysis

Graphpad prism 5 software was used for statistical analysis and for plotting graphs. EEG records and biochemical analysis were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) and latency was carried out by the Student's t test. Wave amplitude was analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post hoc test. A probability of $p < 0.05$ was considered significant. All data are reported as mean and S.E.M.

Results

In order to investigate whether previous administration of AFB1 (250 µg/kg v.o.) facilitates seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ (30 mg/kg i.p.) in male Wistar rats we monitored the animals for the appearance of myoclonic jerks and generalized seizures. Figure 1 shows the representative electroencephalographic recording after vehicle (DMSO) and PTZ administration (Fig 1A and 1B), and following recordings after AFB1 and PTZ administration (Fig 1C and 1D, respectively). We found a facilitation in seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ after AFB1 exposure since the latency for first myoclonic jerk is lower than in vehicle group. It could also be visualized in Figure 1G, where statistical analyses revealed that AFB1 decreased latency for myoclonic jerks ($U(20.50)=0.0277$, Fig. 1G) induced by a subconvulsant dose of PTZ.

Figure 1E shows the EEG wave amplitude for all period of analysis. Basal period comprehend the first fifteen minutes for adaptation to animal to the apparatus, so AFB1 or vehicle (DMSO) were administrated and observed for one hour, and the last fifteen minutes corresponds to PTZ administration. Statistical analyses shows that AFB1 or PTZ does not modify the wave amplitude for all the period observed ($F(89,979)=0.9718$; $P=0.5550$). Figure 1F shows the wave amplitude for each period of EEG. We found that AFB1 and PTZ does not alter wave amplitude ($F(1,11)=0.3852$; $P=0.5475$, Fig. 2) in each period.

Since AFB1 facilitates the development of seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ we decided to study the possible mechanisms associated with its toxic effects. In this context, we found decreased total Na^+ , K^+ -ATPase and $\alpha 1$ subunit activity in cerebral cortex after AFB1 and PTZ treatment ($F(1,22)=6.155$; $P=0.0212$, Fig 2A; ($F(1,22)=6.073$; $P=0.0220$, Fig 2B)). In addition, PTZ administration reduced $\alpha 2/\alpha 3$ subunit activity ($F(1,22)=7.467$; $P=0.0122$, Fig 2C) in cerebral cortex of rats.

Furthermore, in hippocampus PTZ reduced total Na^+ , K^+ -ATPase and $\alpha 2/\alpha 3$ subunit activity ($F(1,22)=14.54$; $P=0.0010$; $F(1,22)=8.478$; $P=0.0081$, Fig 3A and Fig 3C) without alterations in $\alpha 1$ subunit activity ($F(1,22)=3.071$; $P=0.0936$; Fig 3B). AFB1 does not modify Na^+ , K^+ -ATPase activity and subunits in hippocampus.

Regarding the involvement of oxidative stress on toxic effects induced by AFB1, we investigated enzymatic indicators of oxidative stress in the cerebral cortex after mycotoxin exposition. Statistical analysis showed that CAT activity was not altered by AFB1 or PTZ in

the cerebral cortex ($F(1,22)=0.008963$; $P=0.9254$, Table 1). Moreover, we evaluated the effect of AFB1 and PTZ on GST activity of cerebral cortex. Statistical analysis showed that mycotoxin and PTZ does not modify GST activity of cerebral cortex ($F(1,22)= 4.006$; $P=0.0578$, Table 1).

Discussion

The presence of mycotoxins in food is a recurrent problem in many countries, so many studies have focused mainly on the chronic toxic effects of these mycotoxins mainly aflatoxins, because of their carcinogenicity, hepatotoxicity and mutagenicity (Hussein and Brasel 2001). In addition, few studies report the acute effects of exposure on gastrointestinal, respiratory, cardiovascular and central nervous systems, in humans and animals, after the exposure to common aflatoxins (IARC 1993; Peraica, Radic et al. 1999; Hussein and Brasel 2001). In the present study, we investigated the effects of acute oral exposure to aflatoxin B1 on development of seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ. We showed that latency for first myoclonic jerk is reduced, demonstrating the facilitatory effect of AFB1. Additionally, we found decreased total Na^+ , K^+ -ATPase, $\alpha 1$ and $\alpha 2/3$ subunit activity in cerebral cortex after AFB1 and PTZ treatment. In hippocampus, PTZ reduced total Na^+ , K^+ -ATPase and $\alpha 2/\alpha 3$ subunit activity without alterations in $\alpha 1$ subunit activity. AFB1 does not modify Na^+ , K^+ -ATPase activity and subunits in hippocampus. Moreover, CAT and GST activities were not altered by AFB1 or PTZ in the cerebral cortex.

Little information about the effects of aflatoxins on the central nervous system of animals is available. It is known that AFB1 causes an alteration in the metabolism of tryptophan in the brain, which reduces concentrations of serotonin (Kimbrough, Llewellyn et al. 1992). Additionally, it has been showed that repeated injections of AFB1(16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.p./ 6 weeks) in rats increases central and peripheral Na^+ , K^+ -ATPase, β -glucuronidase, and β -galactosidase, and decreases the activity of Mg^{2+} -ATPase (Ikegwonu 1983). Moreover, a repeated exposure to AFB1 decreases striatal dopamine and serotonin concentrations, 37 and 29% respectively, suggesting that the major effect of AFB1 is on dopaminergic pathways, possible by selectively perturbing the conversion of tyrosine to biogenic catecholamine neurotransmitters (Coulombe and Sharma 1985). Acute AFB1 exposure decreased brain acetylcholinesterase, whereas the chronic exposure increased adenohipophyseal acetylcholinesterase (Egbunike and Ikegwonu 1984). Thus, these changes in the levels of

neurotransmitters and enzymes may alter the behavior of animals, so it is possible that dietary intake of this mycotoxin may be one of the causes of certain idiopathic and debilitating diseases in humans, such as epilepsy. In this line of view, we showed the facilitatory effect of AFB1 on development of seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ.

In the brain, Na⁺,K⁺-ATPase activity plays an important role since changes in its activity can influence neuronal excitability (Moseley, Williams et al. 2007). Accordingly, current evidence supports that decreased Na⁺,K⁺-ATPase enhances neuronal excitability and facilitates the development of convulsions (Haglund and Schwartzkroin 1990). As well as a decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity directly affects the signaling of neurotransmitters and neuronal activity as a consequence the whole animal behavior (Lees, Lehmann et al. 1990; Jamme, Petit et al. 1995; Li and Stys 2001). In addition, it is also remarkable that decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity has been found in the *post-mortem* epileptic human brain (Grisar, Guillaume et al. 1992), and that seizures are a hallmark of the phenotype associated with mutations in the Na⁺,K⁺-ATPase subunit gene in humans (Deprez 2008; Poulsen, Khandelia et al. 2010). It has been described three Na⁺,K⁺-ATPase isoforms in the brain. The α 1 isoform is found in many cell types, the α 2 isoform predominantly found in glia and hippocampal pyramidal cells, and the α 3 isoform expressed only in neurons (Moseley et al., 2007). In this context, it has been proposed a crucial role for α 3 isoform since a mutation in this isoform is responsible to development of epileptiform activity and seizure behavior in mouse (Clapcote et al., 2009). These evidences corroborates with the findings in these study, since we showed a reduced Na⁺,K⁺-ATPase activity and a facilitatory effect of AFB1 on seizures induced by PTZ.

Furthermore, some studies showed a relationship among inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, facilitation of development of seizures induced by PTZ and oxidative stress. It has been demonstrated that treadmill physical training protected against behavioral and electrographically seizures elicited by subconvulsant dose of PTZ, and also protected against the Na⁺, K⁺-ATPase activity inhibition and increase in the levels of oxidative stress markers (Silva, Hoffmann et al. 2011). (Rambo, Ribeiro et al. 2009) showed that creatine supplementation avoided the PTZ-elicited increase in lipoperoxidation and protein carbonylation, as well as decrease in non-protein-thiols content, CAT and SOD activities. Moreover, creatine supplementation prevented PTZ-induced decrease in hippocampal Na⁺, K⁺-ATPase activity, confirming the involvement of oxidative stress in modulating of Na⁺, K⁺-ATPase and the development of seizures induced by PTZ. Accordingly, in this study we showed that AFB1 and PTZ inhibited Na⁺, K⁺-ATPase total, α 1 and α 2/3 activities in cerebral

cortex and hippocampus, and that AFB1 facilitates the development of seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ.

Moreover, several studies show the involvement of oxidative stress in the toxicity induced by AFB1, and attribute this to the characteristic hepatotoxicity induced by this mycotoxin. It is suggested that the toxic effects are mediated by increased production of reactive species such as superoxide anion, hydroxyl radical and hydrogen peroxide during the hepatic metabolism of this mycotoxin (Towner, Qian et al. 2003).

The brain is one of the major organs that generates large amounts of reactive oxygen species (ROS) and is especially vulnerable to oxidative stress because of its lower antioxidant enzyme activities and high quantities of lipids with unsaturated fatty acids, which are targets of lipid peroxidation (Milder and Patel 2012). Under normal conditions, the brain can equilibrate the generated ROS with its own antioxidant defense. Thus, since AFB1 could induce oxidative stress and Na^+, K^+ -ATPase is especially sensitive to oxidative stress (Jamme, Petit et al. 1995; Morel, Tallineau et al. 1998), we investigated the effects of the acute exposition to AFB1 on CAT and GST activities. In this acute protocol, AFB1 does not affect CAT and GST activities in cerebral cortex of rats. However, further detailed studies and other markers of oxidative stress needs to be investigated to definitively establish the role of oxidative stress in brain toxicity of this mycotoxin.

In summary, we concluded that acute exposition to AFB1 have a potential neurotoxic effect demonstrated by facilitation of seizures induced by a subconvulsant dose of PTZ, and inhibition of Na^+, K^+ -ATPase activity seems to be a possible mechanism for this effect, since the markers availed were not altered.

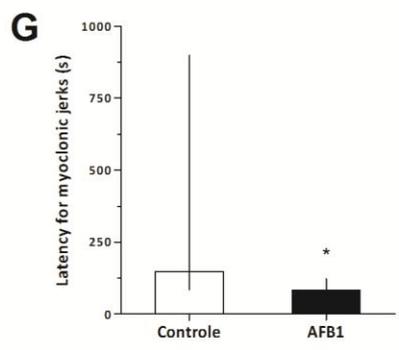
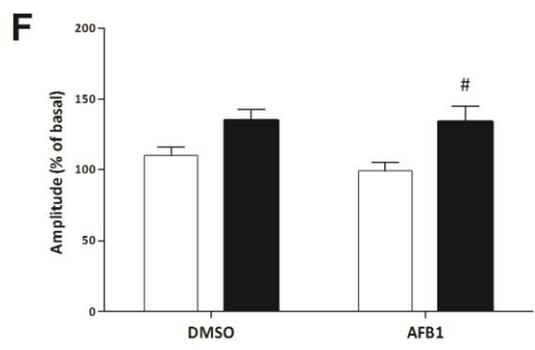
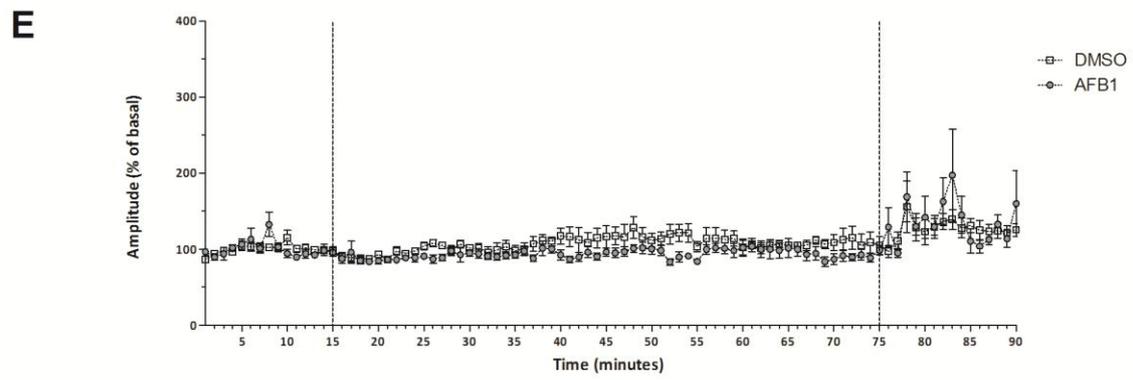
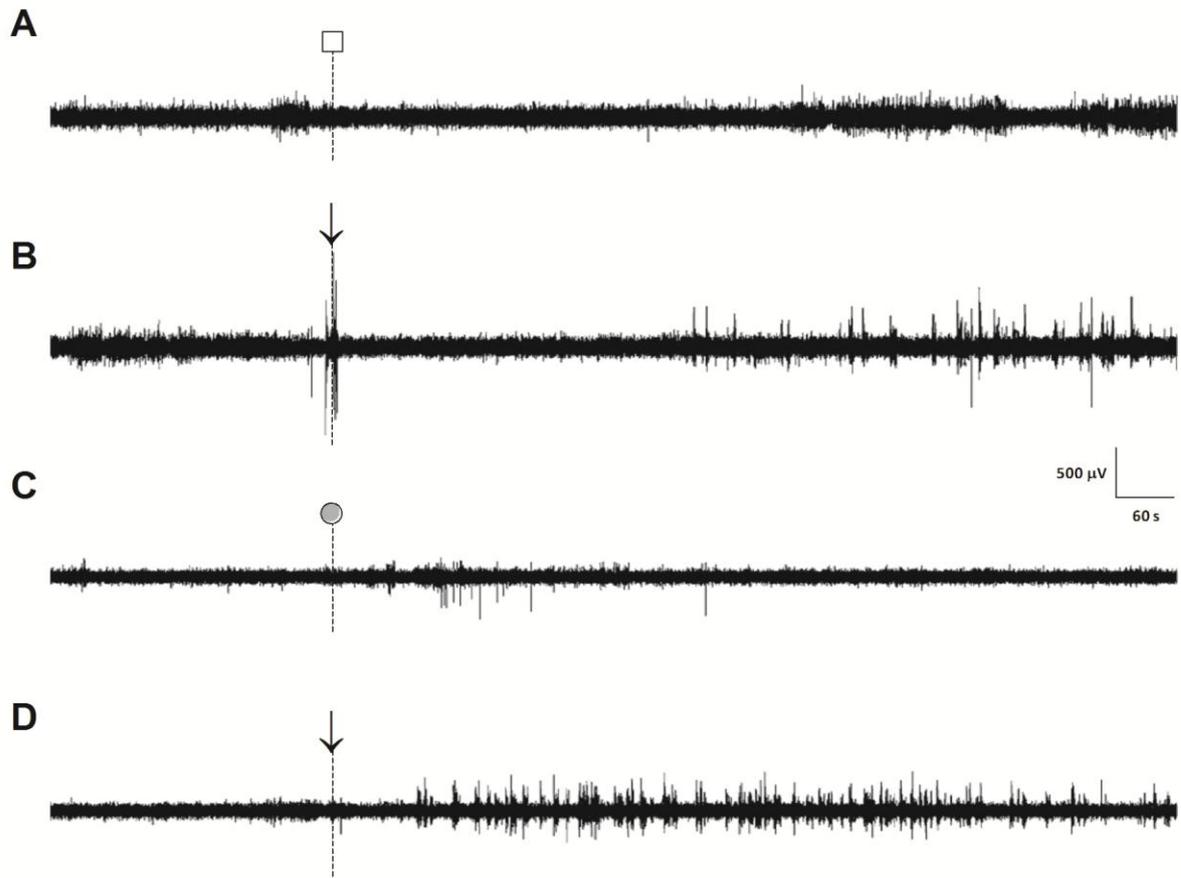
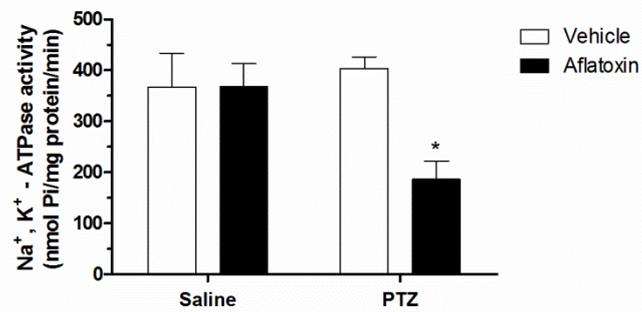


Figure 1: Representative electroencephalographic recordings after (A) DMSO, □ indicates the start of the administration of DMSO; (B) arrow indicates administration of PTZ; (C) AFB1, ● indicates the start of the administration of AFB1; (D) arrow indicates administration of PTZ. Figure A shows the basal period (5 min), and 15 minutes of the period of the administration of DMSO (vehicle). Figure B represents the last 5 minutes from DMSO and the whole period (15 min) of PTZ administration. Figure C shows basal period (5 min), and 15 minutes of the period of the administration of AFB1. Figure D represents the last 5 minutes from AFB1 and the whole period (15 min) of PTZ administration. Figure E shows amplitude quantification minute for minute for the entire record. The quantification of the amplitude is calculated for periods shown in the figure F, and Figure G shows the latency to myoclonic seizure.

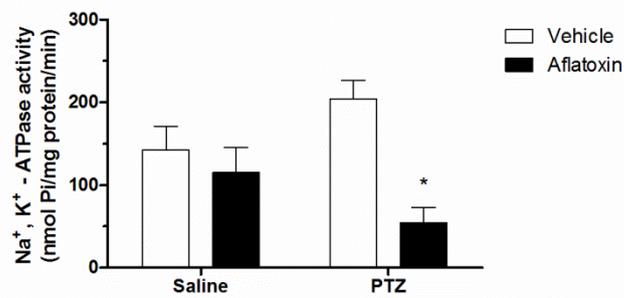
* Indicates a significant difference compared with vehicle group.

Indicates a significant difference compared with AFB1 group.

2A



2B



2C

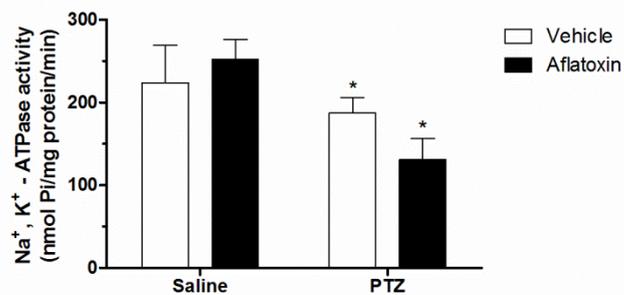


Figure 2: Effect of exposition to AFB1 (250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ v.o.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na^+, K^+ -ATPase (2A), $\alpha 1$ (2B) and $\alpha 2/\alpha 3$ (2C) subunit in cerebral cortex of rats. Data are mean + S.E.M, n=6-7 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with vehicle group.

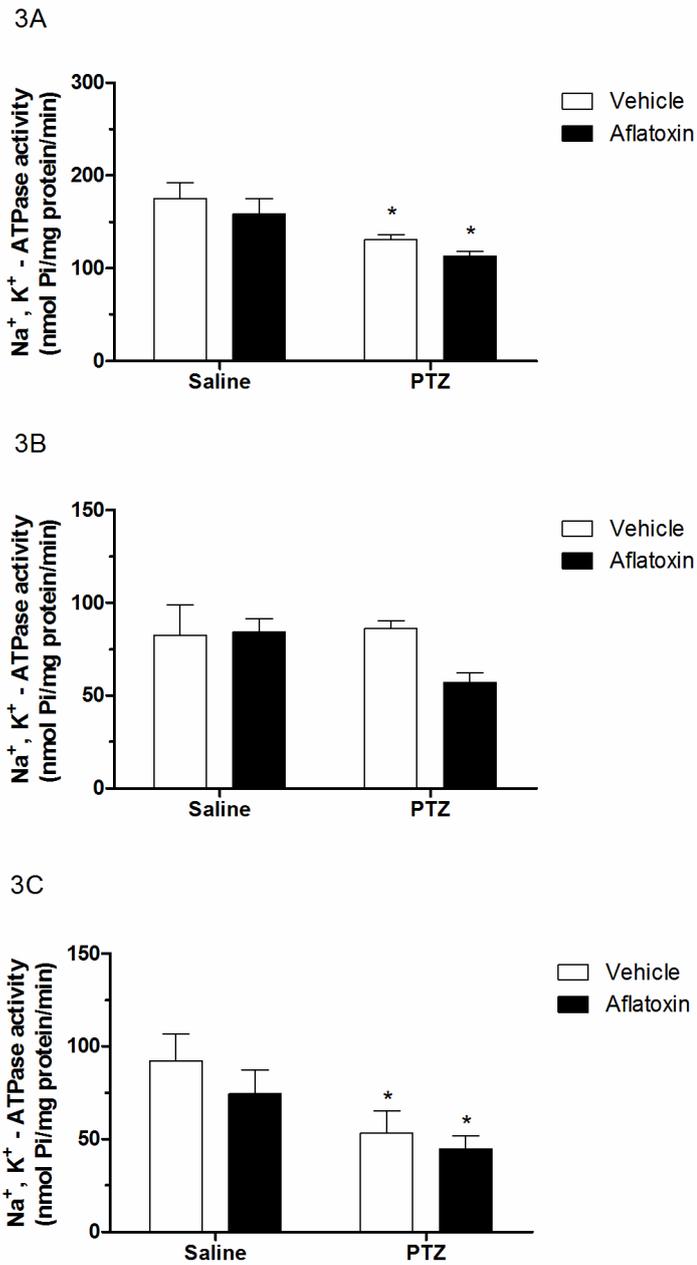


Figure 3: Effect of exposition to AFB1 (250 μ g/kg v.o.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on total activity of Na⁺,K⁺-ATPase (3A), α 1 (3B) and α 2/ α 3 (3C) subunit in hippocampus of rats. Data are mean + S.E.M, n =5-7 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with vehicle group.

Table 1: Effect of exposition to AFB1 (250 µg/kg v.o.) and/or PTZ (30 mg/kg i.p.) on CAT and GST activities of cerebral cortex of rats.

	Vehicle/Saline	Vehicle/PTZ	AFB1/Saline	AFB1/PTZ
CAT	0.43 ± 0.24	0.42 ± 0.12	0.42 ± 0.13	0.40 ± 0.15
GST	71.04 ± 15.43	78.23 ± 18.79	82.76 ± 18.82	62.19 ± 18.77

Data are mean ± S.E.M, n=6-7 animals in each group.

References

- Abdel-Wahhab, M. A., H. H. Ahmed, et al. (2006). "Prevention of aflatoxin B1-initiated hepatotoxicity in rat by marine algae extracts." J Appl Toxicol **26**(3): 229-238.
- Abdel-Wahhab, M. A., N. S. Hassan, et al. (2010). "Red ginseng extract protects against aflatoxin B1 and fumonisins-induced hepatic pre-cancerous lesions in rats." Food Chem Toxicol **48**(2): 733-742.
- Abdel-Wahhab, M. A., S. A. Nada, et al. (1999). "Effect of aluminosilicates and bentonite on aflatoxin-induced developmental toxicity in rat." J Appl Toxicol **19**(3): 199-204.
- Abdel-Wahhab, M. A., S. A. Nada, et al. (1998). "Potential protective effect of HSCAS and bentonite against dietary aflatoxicosis in rat: with special reference to chromosomal aberrations." Nat Toxins **6**(5): 211-218.
- Abdel-Wahhab, M. A., E. A. Omara, et al. (2007). "Zizyphus spina-christi extract protects against aflatoxin B1-initiated hepatic carcinogenicity." Afr J Tradit Complement Altern Med **4**(3): 248-256.
- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol **105**: 121-126.
- Ahmed, N. and U. S. Singh (1984). "Effect of aflatoxin B1 on brain serotonin and catecholamines in chickens." Toxicol Lett **21**(3): 365-367.
- Aperia, A. (2007). "New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target." J Intern Med **261**(1): 44-52.
- Bedard, L. L. and T. E. Massey (2006). "Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair." Cancer Lett **241**(2): 174-183.
- Benarroch, E. E. (2011). "Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease." Neurology **76**(3): 287-293.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bullerman, L. B. (1986). "Mycotoxins and food safety." Food Technol **40**: 59 - 66.
- C., H. B. G. J. M. (1999). "Free Radicals in Biology and Medicine." Clarendon Press **3rd edition**.
- Clapcote, S.J.; Duffy, S.; Xie, G.; Kirshenbaum, G.; Bechard, A.R.; Rodacker Schack, V.; Petersen, J.; Sinai, L.; Saab, B.J. Lerch, J.P.; Minassian, B.A.; Ackerley, C.A.; Sled, J.G.; Cortez, M.A.; Henderson, J.T.; Vilsen, B. Roder, J.C. (2009). Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **106**, pp. 14085–14090
- Chao, T. C., S. M. Maxwell, et al. (1991). "An outbreak of aflatoxicosis and boric acid poisoning in Malaysia: a clinicopathological study." J Pathol **164**(3): 225-233.
- Coppock, R. W., R.G. Christian, and B.J. Jacobsen (2012). "Aflatoxins. In Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles." **2**: 1181 - 1199.
- Coulombe, R. A., Jr. and R. P. Sharma (1985). "Effect of repeated dietary exposure of aflatoxin B1 on brain biogenic amines and metabolites in the rat." Toxicol Appl Pharmacol **80**(3): 496-501.
- Crema, L., M. Schlabitz, et al. (2010). "Na⁺, K⁺ ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior." Neurochem Res **35**(11): 1787-1795.
- Dean, R. T., S. Fu, et al. (1997). "Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation." Biochem J **324 (Pt 1)**: 1-18.

- Deprez, L. W., S.; Peeters, K.; Deconinck, T.; Claeys, K.G.; Claes, L.R.; Suls, A.; Van Dyck, T.; Palmi, A.; Matthijs, G.; Van Paesschen, W. and De Jonghe, P. (2008). "Epilepsy as part of the phenotype associated with ATP1A2 mutations." Epilepsia **49**: 500-508.
- Eaton, D. L., Groopman, J.D. (1994). "The Toxicology of Aflatoxins: Human Health, Veterinary and Agricultural Significance." 45 - 74.
- Egbunike, G. N. and F. I. Ikegwonu (1984). "Effect of aflatoxicosis on acetylcholinesterase activity in the brain and adenohypophysis of the male rat." Neurosci Lett **52**(1-2): 171-174.
- Erecinska, M. and I. A. Silver (1994). "Ions and energy in mammalian brain." Prog Neurobiol **43**(1): 37-71.
- Fiske, C. H. and Y. Subbarow (1925). "The colorimetric determination of phosphorus." Jornal of Biological Chemistry **66**: 375-400.
- Fujisawa, H., K. Kajikawa, et al. (1965). "Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine." Jpn J Pharmacol **15**(4): 327-334.
- Bushby, L.A.; Wogan, G.N. (1981). " In Mycotoxins and N-Nitroso Compounds: Environmental Risks." 3 - 29.
- Garner, R. C. a. M., C. N (1979). "Fungal toxins, aflatoxins and nucleic acids." Chemical Carcinogens and DNA: 187 - 225.
- Grisar, T., D. Guillaume, et al. (1992). "Contribution of Na⁺,K⁺-ATPase to focal epilepsy: a brief review." Epilepsy Res **12**(2): 141-149.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, et al. (1974). "Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation." J Biol Chem **249**(22): 7130-7139.
- Haglund, M. M. and P. A. Schwartzkroin (1990). "Role of Na-K pump potassium regulation and IPSPs in seizures and spreading depression in immature rabbit hippocampal slices." J Neurophysiol **63**(2): 225-239.
- Hussein, H. S. and J. M. Brasel (2001). "Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals." Toxicology **167**(2): 101-134.
- IARC (1993). "Aflatoxins. In: IRAC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans." **56**: 243 - 395.
- IARC (1993). "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items, Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines, Mycotoxins." International Agency for Research on Cancer **56**: 249-395.
- IARC, I. A. f. R. o. C.-. (1976). "In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans." **10**: 51 - 52.
- Ikegwonu, F. I. (1983). "The aflatoxin B₁ in the rats " Toxicology **28**: 247 - 259.
- Ikegwonu, F. I. (1983). "The neurotoxicity of aflatoxin B₁ in the rat." Toxicology **28**(3): 247-259.
- Jamme, I., E. Petit, et al. (1995). "Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁺-ATPase activity by oxygen free radicals." Neuroreport **7**(1): 333-337.
- Jurkat-Rott, K., T. Freilinger, et al. (2004). "Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants." Neurology **62**(10): 1857-1861.
- Kanbur, M., G. Eraslan, et al. (2011). "The effects of evening primrose oil on lipid peroxidation induced by subacute aflatoxin exposure in mice." Food Chem Toxicol **49**(9): 1960-1964.
- Kimbrough, T. D., G. C. Llewellyn, et al. (1992). "The effect of aflatoxin B₁ exposure on serotonin metabolism: response to a tryptophan load." Metab Brain Dis **7**(4): 175-182.
- Kumar, M., V. Verma, et al. (2012). "Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B₁-induced liver carcinogenesis in rats." Br J Nutr **107**(7): 1006-1016.

- Lees, G. J., A. Lehmann, et al. (1990). "The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus." Neurosci Lett **120**(2): 159-162.
- Li, S. and P. K. Stys (2001). "Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter." Neuroscience **107**(4): 675-683.
- McColl, C. D., M. K. Horne, et al. (2003). "Electroencephalographic characterisation of pentylentetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor." Neuropharmacology **44**(2): 234-243.
- Mercer, R. W., Biemesderfer, D., Bliss, D. P., Jr., Collins, J. H., and Forbush, B., III (1993) J. Cell. Biol. **121**, 579–586.
- Milder, J. and M. Patel (2012). "Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet." Epilepsy Res **100**(3): 295-303.
- Morel, P., C. Tallineau, et al. (1998). "Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na+/K+ ATPase in rat striatal synaptosomes." Neurochem Int **33**(6): 531-540.
- Moseley, A. E., M. T. Williams, et al. (2007). "Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice." J Neurosci **27**(3): 616-626.
- Nelson, D. B. K., R., Landrigan, P. S., Hayes, A. W., Yang, G. C., and Benanides, J. (1980). "Aflatoxin and Reye's syndrome: A case control study." Pediatrics **66**: 865 - 869.
- Nishi, A., G. L. Snyder, et al. (1999). "Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons." J Neurochem **72**(5): 2015-2021.
- Peraica, M., B. Radic, et al. (1999). "Toxic effects of mycotoxins in humans." Bull World Health Organ **77**(9): 754-766.
- Poulsen, H., H. Khandelia, et al. (2010). "Neurological disease mutations compromise a C-terminal ion pathway in the Na(+)/K(+)-ATPase." Nature **467**(7311): 99-102.
- Probst, C. N., Henry; Cotty, Peter (2007). "Outbreak of an Acute Aflatoxicosis in Kenya in 2004: Identification of the Causal Agent." Applied and Environmental Microbiology: 2762-2764.
- Program, N. T. (2011). "Aflatoxins. In Report on Carcinogens." **12**.
- Rambo, L. M., L. R. Ribeiro, et al. (2009). "Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylentetrazol-induced seizures." Neurochem Int **55**(5): 333-340.
- Ravinayagam, V., R. Jaganathan, et al. (2012). "Potential Antioxidant Role of Tridham in Managing Oxidative Stress against Aflatoxin-B(1)-Induced Experimental Hepatocellular Carcinoma." Int J Hepatol **2012**: 428373.
- Ryan, N. J., G. R. Hogan, et al. (1979). "Aflatoxin B1; its role in the etiology of Reye's syndrome." Pediatrics **64**(1): 71-75.
- Simjee., S. (2007). "Foodborne diseases." Totowa (NJ): Humana Press: 540.
- Silva, L. F., M. S. Hoffmann, et al. (2011). "The involvement of Na+, K+-ATPase activity and free radical generation in the susceptibility to pentylentetrazol-induced seizures after experimental traumatic brain injury." J Neurol Sci **308**(1-2): 35-40.
- Sohal, R. S. and R. Weindruch (1996). "Oxidative stress, caloric restriction, and aging." Science **273**(5271): 59-63.
- Souza, M. F., A. R. Tome, et al. (1999). "Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver." J Pharm Pharmacol **51**(2): 125-129.
- Strosnider, H., E. Azziz-Baumgartner, et al. (2006). "Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries." Environ Health Perspect **114**(12): 1898-1903.

- Towner, R. A., S. Y. Qian, et al. (2003). "In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile." Free Radic Biol Med **35**(10): 1330-1340.
- Varga, J. F., Jens Christian; Samson, Robert A. (2009). "A reappraisal of fungi producing aflatoxins." World Mycotoxin Journal **2**: 263 - 277.
- Weekley, L. B. and G. C. Llewellyn (1984). "Activities of tryptophan-metabolizing enzymes in liver and brain of rats treated with aflatoxins." Food Chem Toxicol **22**(1): 65-68.
- Williams, J. H., T. D. Phillips, et al. (2004). "Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions." Am J Clin Nutr **80**(5): 1106-1122.
- Wogan, G. N., G. S. Edwards, et al. (1971). "Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs." Cancer Res **31**(12): 1936-1942.
- Wyss, M. and R. Kaddurah-Daouk (2000). "Creatine and creatinine metabolism." Physiol Rev **80**(3): 1107-1213.
- Yener, Z., I. Celik, et al. (2009). "Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats." Food Chem Toxicol **47**(2): 418-424.

5. CONCLUSÕES

5.1 Conclusão Geral

Conclui-se que a AFB1 facilitou as convulsões induzidas por uma dose subconvulsivante de PTZ, observado pela redução da latência para as mioclonias e sugere-se que um dos possíveis mecanismos é a inibição da atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase, pois não houveram alterações nos parâmetros de estresse oxidativo determinados neste modelo de exposição aguda à micotoxina em ratos.

5.2 Conclusões Específicas

1 – A AFB1 reduziu a latência para o desenvolvimento de mioclonias induzidas por uma dose subconvulsivante de PTZ;

2- A amplitude do registro eletroencefalográfico não foi alterada nos animais submetidos à indução de convulsão por PTZ, em exposição aguda à AFB1;

3- A exposição à AFB1 e ao PTZ reduziu a atividade total e as subunidades $\alpha 1$ e $\alpha 2/3$ da enzima Na^+ , K^+ ATPase no córtex cerebral de ratos e, no hipocampo tanto o PTZ como a exposição à AFB1 e ao PTZ diminuíram a atividade total e a subunidade $\alpha 2/3$ da enzima Na^+ , K^+ ATPase;

4- A atividade da enzima catalase não foi alterada no córtex cerebral de ratos expostos agudamente a AFB1 e PTZ;

5- A atividade da enzima glutathiona S-transferase não foi alterada no córtex cerebral de ratos expostos agudamente a AFB1 e PTZ.

6. REFERÊNCIAS

- Abbas, H.K., 2005. Aflatoxin and food safety. Boca Raton: CRC Press.
- Abdel-Wahhab, M.A., Nada, S.A., Farag, I.M., Abbas, N.F., Amra, H.A., 1998. Potential protective effect of HSCAS and bentonite against dietary aflatoxicosis in rat: with special reference to chromosomal aberrations. *Nat Toxins*. 6, 211-8.
- Aguilar, F., Hussain, S.P., Cerutti, P., 1993. Aflatoxin B1 induces the transversion of G-->T in codon 249 of the p53 tumor suppressor gene in human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90, 8586-90.
- Almeida F., A.J., 1998. Influência do beneficiamento, da embalagem e do ambiente de armazenamento na qualidade sanitária de sementes de amendoim. *Ol. Fibros*. 2, 97-102.
- Alonso-Gonzalez, L., Dominguez, A., Albornoz, J., 2006. Direct determination of the influence of extreme temperature on transposition and structural mutation rates of *Drosophila melanogaster* mobile elements. *Genetica*. 128, 11-9.
- Anderson, D., 1996. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res*. 350, 103-8.
- Aperia, A., 2007. New roles for an old enzyme: Na,K-ATPase emerges as an interesting drug target. *J Intern Med*. 261, 44-52.
- Arnaiz, S.L., Travacio, M., Llesuy, S., Arnaiz, g., 1998. Regional vulnerability to oxidative stress in a modelo f experimental epilepsy. *Neurochem. Res*. 23, 1477-1483.
- Bagh, M.B., Maiti, A.K., Jana, S., Banerjee, K., Roy, A., Chakrabarti, S., 2008. Quinone and oxyradical scavenging properties of N-acetylcysteine prevent dopamine mediated inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase and mitochondrial electron transport chain activity in rat brain: implications in the neuroprotective therapy of Parkinson's disease. *Free Radic Res*. 42, 574-81.
- Barja, G., 2004. Free radicals and aging. *Trends Neurosci*. 27, 595-600.
- Barreiros, A.L.B.S.D., M., 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nov*. 29, 113-123.
- Bashkatova, V., Narkevich, V., Vitskova, G., Vanin, A., 2003. The influence of anticonvulsivante drugs on nitric oxide levels and lipid peroxidation in the rat brain during penthylene-tetrazole-induced epileptiform model seizures. *Prog Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 27, 487-492.
- Bedard, L.L., Massey, T.E., 2006. Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett*. 241, 174-83.
- Beer, J., 1991. Doenças infecciosas dos animais domésticos. 2, 837.
- Benarroch, E.E., 2011. Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology*. 76, 287-93.
- Benzi, G., Moretti, A., 1995. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging*. 16, 661-74.
- Berg, M., Bruhn, T., Frandsen, A., Schousboe, A., Diemer, N.H., 1995. Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: role of calcium homeostasis. *J Neurosci Res*. 40, 641-6.
- Bhat, R.V.M., J. D., 1991. Mycotoxins and food supply. *Food Nutr. Agric*. 1, 27-31.
- Bhatnagar, D., Ehrlich, K.C., Cleveland, T.E., 2003. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol*. 61, 83-93.
- Biehl, M.L.B., W.B., 1987. Chemical contaminants: their metabolism and their residues. *J. Food Protec*. 50, 1058-1073.

- Bischof, K.R., S. K., 2007. Liver Toxicity. In: Gupta,R.C. Veterinary Toxicology – Basic and Clinical Principles., 145-160.
- Blanco, G., Mercer, R.W., 1998. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 275, F633-50.
- Blanco, G., Sanchez, G., Melton, R.J., Tourtellotte, W.G., Mercer, R.W., 2000. The alpha4 isoform of the Na,K-ATPase is expressed in the germ cells of the testes. *J Histochem Cytochem.* 48, 1023-32.
- Bok, J.W., Keller, N.P., 2004. LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot Cell.* 3, 527-35.
- Brera C; Miraglia M; Colatosti, M., 1998. Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: Sources of errors. *Microchem. J.* 59, 45-49.
- Bressac, B., Kew, M., Wands, J., Ozturk, M., 1991. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature.* 350, 429-31.
- Bruno, R.L.A., 2000. Qualidade fisiológica e microflora de sementes de amendoim cv. Br-1 durante o armazenamento. *Ol. Fibros.* 4, 141-152.
- Bullerman, L.B., 1986. Mycotoxins and food safety. *Food Technol.* 40, 59 - 66.
- Burgueira, J.A., 1986. Presence of aflatoxin B1 in human liver referred to as Reye's Syndrome in Venezuela. *Acta Cient. Venez.* 37, 325.
- C., H.B.G.J.M., 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Clarendon Press. 3rd edition.
- Chance, B.S., H.; Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolismo in mammalian organs. *Physiology Review.* 59 527-605.
- Cimen, M.Y., 2008. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 390, 1-11.
- Cole, R.J.C., R.M., 1981. In: Handbook of Toxic Fungal Metabolites. 89, 937-942.
- Coppock, R.W., R.G. Christian, and B.J. Jacobsen, 2012. Aflatoxins. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles.* 2, 1181 - 1199.
- Coulombe, R.A., 1991. Aflatoxins. *Mycotoxins and phytoalexins.*, 103-143.
- Coulombe, R.A., Jr., Sharma, R.P., 1985. Effect of repeated dietary exposure of aflatoxin B1 on brain biogenic amines and metabolites in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* 80, 496-501.
- Crambert, G., Hasler, U., Beggah, A.T., Yu, C., Modyanov, N.N., Horisberger, J.D., Lelievre, L., Geering, K., 2000. Transport and pharmacological properties of nine different human Na, K-ATPase isozymes. *J Biol Chem.* 275, 1976-86.
- Crema, L., Schlabitz, M., Tagliari, B., Cunha, A., Simao, F., Krolow, R., Pettenuzzo, L., Salbego, C., Vendite, D., Wyse, A.T., Dalmaz, C., 2010. Na⁺, K⁺ ATPase activity is reduced in amygdala of rats with chronic stress-induced anxiety-like behavior. *Neurochem Res.* 35, 1787-95.
- Dal-Pizzol, F., Klamt, F., Vianna, M.M., Schroder, N., Quevedo, J., Benfato, M.S., Moreira, J.C., Walz, R., 2000. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. *Neurosci Lett.* 291, 179-82.
- Dean, R.B., 1941. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. *Biologiya Symposia* 3, 331-348.
- Dean, R.T., Fu, S., Stocker, R., Davies, M.J., 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J.* 324 (Pt 1), 1-18.
- Devlin, T.M., 2007. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. 6ª edição.
- Diniz, S.P.S.S., 2006. Micotoxinas. . Livraria e Editora Rural., 181.
- Dostanic-Larson, I.L., J.N.; Van Huysse, J.W.; Neumann, J.C.; Moseley, A.E.; Lingrel, J.B., 2006. Physiological role of the α1- and α2 – isoforms of Na⁺,K⁺-ATPase and

- biological significance of their cardiac glycoside binding site. *American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 290, 524-528.
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 82, 47-95.
- El-Agmy, 2010. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. *Arch. Toxicol*. 84 389-396.
- El-Nekeety, A.A., Mohamed, S.R., Hathout, A.S., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. *Toxicol*. 57, 984-91.
- Erecinska, M., Silver, I.A., 1994. Ions and energy in mammalian brain. *Prog Neurobiol*. 43, 37-71.
- Erecinska, M., Cherian, S., Silver, I.A., 2004. Energy metabolism in mammalian brain during development. *Prog Neurobiol*. 73, 397-445.
- Essigmann, J.M., Croy, R.G., Bennett, R.A., Wogan, G.N., 1982. Metabolic activation of aflatoxin B1: patterns of DNA adduct formation, removal, and excretion in relation to carcinogenesis. *Drug Metab Rev*. 13, 581-602.
- Esterbauer, H., Benedetti, A., Lang, J., Fulcheri, R., Fauler, G., Comporti, M., 1986. Studies on the mechanism of formation of 4-hydroxynonenal during microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta*. 876, 154-66.
- Ferreira, A.G., Stefanello, F.M., Cunha, A.A., da Cunha, M.J., Pereira, T.C., Bonan, C.D., Bogo, M.R., Netto, C.A., Wyse, A.T., 2011. Role of antioxidants on Na(+),K (+)-ATPase activity and gene expression in cerebral cortex of hyperprolinemic rats. *Metab Brain Dis*. 26, 141-7.
- Figuera, M.R., Bonini, J.S., Oliveira, T.G., Frussa-Filho, R., Rocha, J.B.T., Dutra-Filho, M.A., Mello, C.F., 2003. GM1 ganglioside attenuates convulsions and thiobarbituric acid. *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 35, 465-473.
- Figuera, M.R., Royes, L.F.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Frussa-Filho, R., Petry, J.c., Coelho, R.C., Mello, C.F., 2006. GM1 ganglioside prevent seizures, NAK activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiology of Disease*. 22, 611-623.
- Figuera, M.R.Q., C.M.; Stracke, M.P.; Ninbauer, M.C.; Gonzales-Rodrigues, L.L.; Frussa-Filho, R.; Wajner, M.; De Mello, C.F., 1999. Ascorbic acid and α -tocopherol attenuate methylmalonic acid-induced convulsions. *Neuroreport*. 10, 2039-2043.
- Floyd, R.A., 1984. Free radicals in molecular biology. *Aging and disease*. 416.
- Floyd, R.A., 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J*. 4, 2587-97.
- Forrester, L.M., Neal, G.E., Judah, D.J., Glancey, M.J., Wolf, C.R., 1990. Evidence for involvement of multiple forms of cytochrome P-450 in aflatoxin B1 metabolism in human liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87, 8306-10.
- Frisvad, J.C.S., R. A., 1992. Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage and mycotoxin production. *Food and Feeds*., 31-68.
- Fujisawa, H., Kajikawa, K., Ohi, Y., Hashimoto, Y., Yoshida, H., 1965. Movement of radioactive calcium in brain slices and influences on it of protoveratrine, ouabain, potassium chloride and cocaine. *Jpn J Pharmacol*. 15, 327-34.
- Garner, R.C.a.M., C. N., 1979. Fungal toxins, aflatoxins and nucleic acids. *Chemical Carcinogens and DNA*. 187 - 225.
- Geering, K., 2001. The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J Bioenerg Biomembr*. 33, 425-38.
- Gilgun-Sherki, Y., Rosenbaum, Z., Melamed, E., Offen, D., 2002. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev*. 54, 271-84.

- Goldblatt, L.A., 1977. Mycotoxins – past, present and future. *J Am Oil Chem Soc.* 54, 302A-310A.
- Gonzalez, E.P., M.M.; Felicio, J.D., 2001. Análise de micotoxinas no Instituto Biológico de 1989 a 1999. *Biológico.* 63, 15-9.
- Grisar, T., Guillaume, D., Delgado-Escueta, A.V., 1992. Contribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res.* 12, 141-9.
- Groopman, J.D., Zhu, J.Q., Donahue, P.R., Pikul, A., Zhang, L.S., Chen, J.S., Wogan, G.N., 1992. Molecular dosimetry of urinary aflatoxin-DNA adducts in people living in Guangxi Autonomous Region, People's Republic of China. *Cancer Res.* 52, 45-52.
- Gupta, R.C., Milatovic, D., Dettbarn, W.D., 2001. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. *Neurotoxicology.* 22, 271-82.
- Habiba, A.B., G.; Mercer, R.W., 2000. Expression, activity and distribution of Na⁺,K⁺-ATPase subunits during in vitro neuronal induction. *Brain Research.* 1-13.
- Halliwell, B., 1992. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 59, 1609-23.
- Halliwell, B., 1994. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 52, 253-65.
- Halliwell, B., 2007a. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 35, 1147-50.
- Halliwell, B.G., J. M. C., 1999. Free radicals in biology and medicine. 617-783.
- Halliwell, B.G., J. M. C., 2007b. *Free Rad. Biol. Med.* 880.
- Harris, C.C., 1991. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res.* 51, 5023s-5044s.
- Harris, E.D., 1992. Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase. *J Nutr.* 122, 636-40.
- Hathout, A.S., Mohamed, S.R., El-Nekeety, A.A., Hassan, N.S., Aly, S.E., Abdel-Wahhab, M.A., 2011. Ability of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* to protect against oxidative stress in rats fed aflatoxins-contaminated diet. *Toxicon.* 58, 179-86.
- Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H.S., Steele, J.L., 2009. Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. *Food Chem Toxicol.* 47, 1064-8.
- Heunks, L.M.A.e.a., 1999. Xanthine oxidase is involved in exercise-induced oxidative stress in chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of physiology.* 1697-1704.
- Hsieh, D.P., Atkinson, D.N., 1991. Bisfuranoid mycotoxins: their genotoxicity and carcinogenicity. *Adv Exp Med Biol.* 283, 525-32.
- Hussein, H.S., Brasel, J.M., 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology.* 167, 101-34.
- IARC, 1993. Aflatoxins. In: *IRAC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.* 56, 243 - 395.
- IARC, I.A.f.R.o.C.-. 1976. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.* 10, 51 - 52.
- Ikegwonu, F.I., 1983. The neurotoxicity of aflatoxin B1 in the rat. *Toxicology.* 28, 247-59.
- Jaimez, J., Fente, C.A., Vazquez, B.I., Franco, C.M., Cepeda, A., Mahuzier, G., Prognon, P., 2000. Application of the assay of aflatoxins by liquid chromatography with fluorescence detection in food analysis. *J Chromatogr A.* 882, 1-10.
- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J.M., Nouvelot, A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport.* 7, 333-7.
- JECFA, 2001. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: World. Health. Organization.
- JECFA., 1995. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Aditives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: World. Health.

- JECFA., 1998. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Safety evaluation of certain food additives and contaminants – Aflatoxins. Geneva: World Health.
- Jelinek, C.F., Pohland, A.E., Wood, G.E., 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds--an update. *J Assoc Off Anal Chem.* 72, 223-30.
- Jorgensen, P.L., Hakansson, K.O., Karlsh, S.J., 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol.* 65, 817-49.
- Jovicic, M.E., Popovic, M., Nesic, K.J., Popovic, N., Pavlovic, S.J., Rakic, L., 2008. Aging, aluminium and basal forebrain lesions modify substrate kinetics of erythrocyte membrane Na,K-ATPase in the rat. *J Alzheimers Dis.* 14, 85-93.
- Jubert, C., Mata, J., Bench. G., 2009. Effects of Chlorophyll and Chlorophyllin on Low-Dose Aflatoxin B1 Pharmacokinetics in Human Volunteers. *Cancer Prev Res.* 2, 1015-1022.
- Júnior, A.A.J.e.a., 1998. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. *Medicina.* 32, 434-449.
- Jurkat-Rott, K., Freilinger, T., Dreier, J.P., Herzog, J., Gobel, H., Petzold, G.C., Montagna, P., Gasser, T., Lehmann-Horn, F., Dichgans, M., 2004. Variability of familial hemiplegic migraine with novel A1A2 Na⁺/K⁺-ATPase variants. *Neurology.* 62, 1857-61.
- Kabuto, h., Ogawa, N., 1998. Melatonin inhibits iron-induced epileptic discharges in rats by suppressing peroxidation. *Epilepsis.* 39, 237-243.
- Kaplan, J.H., 2002. Biochemistry of Na,K-ATPase. *Annu Rev Biochem.* 71, 511-35.
- Kihara, T.M., T.; Sakamoto, M.; Yasuda, Y.; Yamamoto, Y.E.; Tanimura, T., 2000. Effects of prenatal aflatoxin B1 exposure on behaviors sciences. *Toxicol. Sci., Oxford.* 53, 392-399.
- Kimbrough, T.D., Llewellyn, G.C., Weekley, L.B., 1992. The effect of aflatoxin B1 exposure on serotonin metabolism: response to a tryptophan load. *Metab Brain Dis.* 7, 175-82.
- Kong, L.N., Zuo, P.P., Mu, L., Liu, Y.Y., Yang, N., 2005. Gene expression profile of amyloid beta protein-injected mouse model for Alzheimer disease. *Acta Pharmacol Sin.* 26, 666-72.
- Kumar, M., Verma, V., Nagpal, R., Kumar, A., Behare, P.V., Singh, B., Aggarwal, P.K., 2012. Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and chlorophyllin on aflatoxin-B(1)-induced liver carcinogenesis in rats. *Br J Nutr.* 107, 1006-16.
- Lees, G.J., Lehmann, A., Sandberg, M., Hamberger, A., 1990. The neurotoxicity of ouabain, a sodium-potassium ATPase inhibitor, in the rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 120, 159-62.
- Leeson, S.D., G. J.; Summers, J. D., 1995. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Guelph: University Books. 352.
- Leung, M.C., Diaz-Llano, G., Smith, T.K., 2006. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *J Agric Food Chem.* 54, 9623-35.
- Li, C., Grosdidier, A., Crambert, G., Horisberger, J.D., Michielin, O., Geering, K., 2004. Structural and functional interaction sites between Na,K-ATPase and FXYD proteins. *J Biol Chem.* 279, 38895-902.
- Li, S., Stys, P.K., 2001. Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience.* 107, 675-83.
- Lopina, O.D., 2001. Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Mosc).* 66, 1122-31.
- MacNee, W., 2001. Oxidative stress and lung inflammation in airways disease. *Eur J Pharmacol.* 429, 195-207.
- Mallick, B.N.S., S.; Singh, A., 2010. Mechanism of noradrenaline-induced stimulation of Na⁺,K⁺-ATPase activity in the rat brain: implications on REM sleep deprivation-induced increase in brain excitability. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 336, 3-16.

- Mallmann, C.A.K., C. H.; Almeida, C. A.; Mürmann, L.; Silveira, V. G., 2005. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados, destinados ao consumo humano, no estado do Rio Grande do Sul.
- Malmann, C.D.P., 2007. Micotoxinas e Micotoxicoses em Suínos. Sociedade Vicente Pallotti. 1, 31-73.
- Mannon, J.J., E., 1985. Fungi down on the farm. *New Sci.* 105, 12-16.
- Marisco, P., Ribeiro, M.C., Bonini, J.S., Lima, T.T., Mano, K.C., Brener, G.M., Dutra-Filho, M.A., Mello, C.F., 2003. Ammoia potentiates methylmalonic acid-induced convulsions and TBARS production. *Exp. Neurol.* 182, 455-460.
- Massey, T.E., Stewart, R.K., Daniels, J.M., Liu, L., 1995. Biochemical and molecular aspects of mammalian susceptibility to aflatoxin B1 carcinogenicity. *Proc Soc Exp Biol Med.* 208, 213-27.
- Mello, C.F.B., J.; Jiménez-Bernal, R.E.; Rubin, M.A.; de Bastiani, J.; da Costa, Jr.; Wajner, M., 1996. Itrastratial methylmalonic acid administration induces rotational behavior and convulsions through glutamatergic mechanisms. *Brain Res.* 721, 120-125.
- Mello, M.M.N., E.F.; Oliveira, N.J.F., 1999. Intoxicação de bovinos por aflatoxina B1 presente em polpa cítrica: relato de um surto. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 51, 555-558.
- Middleton, E., Jr., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev.* 52, 673-751.
- Milder, J., Patel, M., 2012. Modulation of oxidative stress and mitochondrial function by the ketogenic diet. *Epilepsy Res.* 100, 295-303.
- Miller, J.D., 1995. Mycotoxins. In: Workshop on Mycotoxins in Food in Africa. International Instit. for Trop. Agric., 18-22.
- Morel, P., Tallineau, C., Pontcharraud, R., Piriou, A., Huguet, F., 1998. Effects of 4-hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺-ATPase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Int.* 33, 531-40.
- Moseley, A.E., Williams, M.T., Schaefer, T.L., Bohanan, C.S., Neumann, J.C., Behbehani, M.M., Vorhees, C.V., Lingrel, J.B., 2007. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci.* 27, 616-26.
- Moss, M.O., 1998. Recent studies of mycotoxins. *Symp Ser Soc Appl Microbiol.* 27, 62S-76S.
- Naffah-Mazzacoratti, M.G.C., E.A.; Ferreira, E.C.; Abdalla, D.S.P.; Amado, D.; Bellissimo, M.I., 2001. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration ar modified in the hippocampus of epileptic rats. *Epilepsy Res.* 46, 121-128.
- Nogueira, J.H.d.C., 2009. Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina. .
- Nohl, H., 1993. Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Br Med Bull.* 49, 653-67.
- Nordberg, J., Arner, E.S., 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31, 1287-312.
- Northolt, M.D.E., H. P.; Paulsch, W. E., 1997. Differences between *Aspergillus flavus* in growth and aflatoxin B1 production in relation to water activity and temperature. *J. Food Prot.* 40, 778-781.
- Oliveira, C.A.F.G., P.M.L., 1997. Aflatoxina M1 em leite e derivados: ocorrência no Brasil e aspectos relativos à legislação. *Hig. Aliment.* 11, 22-25.

- Oliveira, M.S., Furian, A.F., Royes, L.F.F., Fichera, M.R., Myskiw, J.C., Fiorenza, N.G., Mello, C.A., 2004. Ascorbate modulates pentylentetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience*. 128, 721-728.
- Ozturk, M., 1991. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet*. 338, 1356-9.
- Pal Yu, B., 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiology reviews*.
- Pastore, G.M.M., G.A., 2004. Utilização de fungos na indústria de alimentos.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagoulos, N.T., Georgiu, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylentetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci. Lett.* 357, 83-86.
- Picada J.N., K.A.L., Ramos L.L.P. and Saffi J., 2003. O estresse oxidativo e as defesas antioxidantes. 251-264.
- Pompella, A., 1997. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Int J Vitam Nutr Res.* 67, 289-97.
- Program, N.T., 2011. Aflatoxins. In Report on Carcinogens. 12.
- Pryor, W.A., Castle, L., 1984. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides. *Methods Enzymol.* 105, 293-9.
- Puisieux, A., Lim, S., Groopman, J., Ozturk, M., 1991. Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res.* 51, 6185-9.
- Ravinayagam, V., Jaganathan, R., Panchanadham, S., Palanivelu, S., 2012. Potential Antioxidant Role of Tridham in Managing Oxidative Stress against Aflatoxin-B(1)-Induced Experimental Hepatocellular Carcinoma. *Int J Hepatol.* 2012, 428373.
- Reiter, R., Tang, L., Garcia, J.J., Munoz-Hoyos, A., 1997. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci.* 60, 2255-71.
- Ross D, M.P., 1991. Antioxidant defense systems and oxidative stress. 151-70.
- Royes, L.F.F., Fichera, M.R., Furian, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Myskiw, J.C., Frussa-Filho, R., Mello, C.F., 2005. Involvement of NO in the convulsive behavior and oxidative damage induced by the intrastriatal injection of matate. *Neurosci. Lett.* 376, 116-120.
- Rustom, I.Y.S., 1997. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chem.* 59, 57-67.
- Simjee., S., 2007. Foodborne diseases. Totowa (NJ): Humana Press. 540.
- Sabino, M., Prado, G., Inomata, E.I., Pedroso Mde, O., Garcia, R.V., 1989. Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. *Food Addit Contam.* 6, 327-31.
- Sabino, M., 1996. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. Atheneu. 461-472.
- Salud, O.-O.P.d.L., 1983. Micotoxinas.
- Santin, E., 2005. Mould growth and mycotoxin production., 225- 234.
- Santurio, J.M., 2000. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2, 01-12.
- Sharma, R.P.S., D.K., 1991. Introduction to mycotoxins. *Mycotoxins and phytoalexins.*, 775.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91, 10771-8.
- Sies, H., Cadenas, E., 1985. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 311, 617-31.
- Skou, J.C., 1957. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim Biophys Acta.* 23, 394-401.
- Skou, J.C., Esmann, M., 1992. The Na,K-ATPase. *J Bioenerg Biomembr.* 24, 249-61.

- Smith, J.E., Solomons, G., Lewis, C., Anderson, J.G., 1995. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. *Nat Toxins*. 3, 187-92; discussion 221.
- Sohal, R.S., Weindruch, R., 1996. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science*. 273, 59-63.
- Souza, M.A., ; Oliveira, M.S.; Furian, A.F.; Rambo, L.M.; Ribeiro, L.R.; Lima, F.D.; Dalla, Corte, L.C.; Silva, L.F.; Retamoso, L.T.; Dalla, Corte, C.L.; Puntel, G.O.; DE, Avila, D.S.; Soares, F.A.; Fichera, M.R.; De, Mello, C.F.; Royes, L.F., 2009. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia*. 50, 811-823.
- Souza, M.F., Tome, A.R., Rao, V.S., 1999. Inhibition by the bioflavonoid ternatin of aflatoxin B1-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Pharm Pharmacol*. 51, 125-9.
- Stahl, W.L., Harris, W.E., 1986. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. *Adv Neurol*. 44, 681-93.
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M., Bhat, R.V., Breiman, R., Brune, M.N., DeCock, K., Dilley, A., Groopman, J., Hell, K., Henry, S.H., Jeffers, D., Jolly, C., Jolly, P., Kibata, G.N., Lewis, L., Liu, X., Luber, G., McCoy, L., Mensah, P., Miraglia, M., Misore, A., Njapau, H., Ong, C.N., Onsongo, M.T., Page, S.W., Park, D., Patel, M., Phillips, T., Pineiro, M., Pronczuk, J., Rogers, H.S., Rubin, C., Sabino, M., Schaafsma, A., Shephard, G., Stroka, J., Wild, C., Williams, J.T., Wilson, D., 2006. Workgroup report: public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environ Health Perspect*. 114, 1898-903.
- Teixeira, A., 2008. Adequação e apresentação de parâmetros de Validação intralaboratorial de um ensaio para a quantificação de Aflatoxina em Castanha-do-Brasil (*Berthollitia excelsa* Bonpl.) através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- Therien, A.G., Blostein, R., 2000. Mechanisms of sodium pump regulation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279, C541-66.
- Towner, R.A., Qian, S.Y., Kadiiska, M.B., Mason, R.P., 2003. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. *Free Radic Biol Med*. 35, 1330-40.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 160, 1-40.
- Varga, J.F., Jens Christian; Samson, Robert A., 2009. A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*. 2, 263 - 277.
- Vega, J.D., J.; Serrano, E.; Carbonell, F., 2002. Oxidative Stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine*. 30, 1782-1786.
- Verma, R.J., Mathuria, N., 2008. Curcumin ameliorates aflatoxin-induced lipid-peroxidation in liver and kidney of mice. *Acta Pol Pharm*. 65, 195-202.
- Vieira, S.L., 1995. Micotoxinas e produção de ovos, Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em aves. 65-80.
- Voet, D.V., J.G.; Pratt, C.W., 2000. Aminoácido. In: *Fundamentos de Bioquímica*. Artes Médicas Sul. 3 ed.
- Wild, C.P., Turner, P.C., 2002. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. 17, 471-81.
- Williams, J.H., Phillips, T.D., Jolly, P.E., Stiles, J.K., Jolly, C.M., Aggarwal, D., 2004. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr*. 80, 1106-22.
- Wogan, G.N., Edwards, G.S., Newberne, P.M., 1971. Structure-activity relationships in toxicity and carcinogenicity of aflatoxins and analogs. *Cancer Res*. 31, 1936-42.
- Wogan, G.N., 1992. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Prog Clin Biol Res*. 374, 123-37.
- Wong, G.J., 1998. Mycotoxins and mycotoxicoses: aflatoxin.

- Wyatt, R.D., 1991. Poultry. In: Mycotoxins and Animal Foods. 24, 553-605.
- Wyse, A.T.S., Streck, E.L., Barros, S.V.T., Brusque, A.M., Zugno, A.I., Wajner, M. , 2000. Methylmalonate administration decrease Na⁺,K⁺-ATPase activity cerebral córtex of rats. *Neuroreport*. 11, 1010-1014.
- Yener, Z., Celik, I., Ilhan, F., Bal, R., 2009. Effects of *Urtica dioica* L. seed on lipid peroxidation, antioxidants and liver pathology in aflatoxin-induced tissue injury in rats. *Food Chem Toxicol*. 47, 418-24.