



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIELEN DE SOUZA

**EFEITO DE *LACTOBACILLUS* SPP. EM FRANGOS DE
CORTE EXPOSTOS AO DESOXINIVALENOL**

Londrina
2020

MARIELEN DE SOUZA

**EFEITO DE *LACTOBACILLUS* SPP. EM FRANGOS DE
CORTE EXPOSTOS AO DESOXINIVALENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula F. R. L. Bracarense

Co-orientadora: Prof.^ª Dr.^a Ana Angelita S. Baptista

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S729a de Souza, Marielen de Souza.
EFEITO DE *Lactobacillus* spp. EM FRANGOS DE CORTE EXPOSTOS AO DESOXINIVALENOL / Marielen de Souza de Souza. - Londrina, 2020.
64 f. : il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.
Coorientador: Ana Angelita Sampaio Baptista.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.

1. Saúde intestinal - Tese. 2. Micotoxinas - Tese. 3. Detoxificação - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, Ana Paula. II. Sampaio Baptista, Ana Angelita. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

CDU 619

MARIELEN DE SOUZA

**EFEITO DE *LACTOBACILLUS* SPP. EM FRANGOS DE
CORTE EXPOSTOS AO DESOXINIVALENOL**

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Paula F. R. L.
Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof.^a Dr.^a Joice Sifuentes dos Santos
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Prof. Dr Raphael Lucio Andreatti Filho
Universidade Estadual Paulista – UNESP
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia -
FMVZ

Londrina, 13 de março de 2020.

Dedico este trabalho ao meu amado “vô Dorva”
(Durvalino Falasca) *in memoriam*

Em um evento da área certa vez ouvi um palestrante dizer que uma vez no mercado da avicultura o profissional nunca mais o deixa. Acredito que foi o meu avô quem me inseriu nesse mercado ainda criança, me deixando brincar e ajudar em sua granja de frangos. Ele era o meu maior fã e incentivador a seguir em frente na carreira de Médica Veterinária. A saudade sempre existirá, porém sei que de onde ele estiver estará torcendo por mim.

AGRADECIMENTOS

Estes últimos dois anos estão sendo totalmente fora da minha zona de conforto, porém a vida é feita de ciclos e tudo passa, felizmente tenho muito mais pelo o que agradecer do que motivos para reclamar.

Gostaria de fazer um agradecimento especial a minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Paula F. R. L. Bracarense, por todo o suporte durante a realização deste trabalho, e a minha co-orientadora, Prof^a Dr^a Ana Angelita S. Baptista, que também me deu muito suporte, estando presente durante todas as coletas, mesmo grávida. Muita gratidão a dedicação de vocês duas.

Aos membros da banca Prof^a Dr^a Joice Sifuentes dos Santos e Prof^o Dr Raphael Lucio Andretti Filho, pela disponibilidade em colaborar com sua participação e correções. As Profs^a Dr^a Giovana Wingter Di Santis e Dr^a Juliana Rubira Gerez, pela disponibilidade em participar como membros suplentes.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e ao programa de pós-graduação em Ciência Animal, pelos recursos disponibilizados.

Este trabalho só foi possível graças a colaboração com outros laboratórios e instituições, quero deixar registrada a minha gratidão ao Dr Eduardo Micotti da Glória - Esalq-USP, pela produção do extrato bruto de DON; ao Prof^o Dr Alexandre Oba e sua equipe de pós graduandos (Angélica, João e Verena), pela formulação das dietas experimentais e auxílio durante o preparo das mesmas; ao Prof^o Dr João Luis Garcia e a técnica de laboratório Beatriz Lino, pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Protozoologia – UEL; ao Prof^o Dr Waldiceu Aparecido Verri Júnior e pós-graduanda Camila Ferraz, pela colaboração na realização dos ensaios de estresse oxidativo. Também quero agradecer aos pesquisadores que isolaram as cepas de *Lactobacillus* spp. em estudos prévios a minha pesquisa.

Agradeço a Prof^a Dr^a Fernanda Pinto Ferreira, pela colaboração na confecção da representação gráfica do esquema experimental.

Um agradecimento mais do que especial a toda equipe do Laboratório de Medicina Aviária – UEL, Maísa, Larissa, Beatriz, Sérgio, Laércio, Claudinéia, João, Letícia, Maria Eduarda, Rafaela e Taís. A colaboração de todos foi essencial para que a execução do experimento se concretizasse, em especial, as residentes Maísa Menck e Larissa Justino, que estavam presentes todos os dias durante o manejo das aves e disponíveis para ajudar no que fosse necessário.

Outro agradecimento muito especial a toda a equipe do Laboratório de Patologia

Animal: Cláudia, Leila, Lucas, Andressa, Ricardo, Juliana, Amanda, Camila, Milton, Victor, Vivian, Taynara, Thalita, Ana, Felipe, Cícero, Bárbara, Melissa, Ariel, Nádia e Gabriele. Muito obrigada a todos vocês, por me acolherem com muito carinho e por toda a colaboração durante a realização do experimento e processamento do material.

Aos queridos amigos de pós-graduação que tornam o trabalho muito mais leve: Gabriela Ruiz, Juliana Bernardes e Aline Paschoal.

Também quero agradecer a minha psicóloga Vilma, que me ajuda a superar os desafios do caminho. A minha querida amiga Nara, que está sempre disponível para me ouvir, aconselhar e compartilhar dos bons e maus momentos. A minha cachorra Aurora, que enche os meus dias de alegria e carinho.

Por último, mas não menos importante, quero agradecer a Deus, que sempre é o meu alicerce em todos os momentos, e a minha amada família, que está sempre ao meu lado me proporcionando suporte emocional, psicológico e financeiro.

SOUZA, Marielen. **Efeito de *Lactobacillus* spp. em frangos de corte expostos ao desoxinivalenol.** 2020. 65 f. Dissertação (Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

A avicultura contribui com importante parcela do produto interno bruto brasileiro, devido a sua crescente eficiência, em que se destacam os avanços em genética, nutrição e sanidade. A saúde animal pode ser afetada pela ingestão aguda ou crônica de micotoxinas, metabólitos produzidos por fungos, que contaminam 80% dos grãos mundialmente. Estratégias para mitigar os danos induzidos por estes compostos, como a biotransformação, podem contribuir com a produção e sanidade avícola. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização de um pool de *Lactobacillus* spp. em diferentes apresentações sobre a saúde de frangos de corte alimentados com uma dieta contaminada por desoxinivalenol (DON) a uma concentração de 19,3 mg kg⁻¹. Para tanto frangos de corte (n 50) com um dia de vida (dv) foram divididos em cinco tratamentos: controle, DON (19,3 mg kg⁻¹), *Lactobacillus* spp. viável + DON (LV+DON), *Lactobacillus* spp. inativado pelo calor + DON (LI+DON) e *Lactobacillus* spp. sobrenadante de cultura + DON (LS+DON). A ingestão da dieta contaminada iniciou-se aos 7 dv. O pool de *Lactobacillus* spp. foi fornecido via gavagem a partir do segundo dv. Aos 14 dv, os animais foram eutanasiados e fragmentos de duodeno, jejuno, íleo, ceco, fígado e rins foram colhidos para avaliação histomorfométrica. A resposta ao estresse oxidativo foi avaliada por meio dos testes *Thiobarbituric Acid Reactive Substances* (TBARS) e *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT); e a resposta antioxidante por meio dos testes *reducing of 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid* (ABTS), *ferric reducing ability* (FRAP) e *reduced glutathione* (GSH). A ingestão de DON induziu lesões intestinais e hepáticas significativas em comparação com os demais tratamentos, enquanto que os tratamentos com *Lactobacillus* spp. (TL) permaneceram semelhantes ao controle. Redução na altura de vilosidades e aumento na profundidade de criptas intestinais foram observadas no grupo DON em comparação ao controle. Todos os TL apresentaram profundidade de cripta similar ao controle, e uma maior relação vilo:cripta no duodeno e jejuno. No íleo apenas LV+DON melhorou a relação vilo:cripta. A ingestão de dieta com DON aumentou a contagem de células calciformes no íleo, todos TL apresentaram uma menor contagem em relação ao grupo DON. Exposição ao DON aumentou a contagem de linfócitos intraepiteliais no jejuno e íleo, entretanto LV+DON apresentou uma redução comparado aos demais tratamentos em ambos segmentos intestinais. DON elevou os níveis de TBARS no jejuno, porém os tratamentos LV+DON e LI+DON permaneceram similar ao grupo controle. Uma redução nos níveis de GSH e ABTS foi observada no jejuno. No fígado, DON aumentou os níveis de NBT e reduziu os níveis de FRAP, os TL permaneceram similares ao grupo controle. No rim, TBARS e NBT não foram alterados por DON. Em geral, a capacidade de resposta ao estresse oxidativo no rim se manteve semelhante entre os tratamentos. O pool de *Lactobacillus* spp. utilizado foi capaz de melhorar a saúde intestinal após a exposição ao DON e reduzir o dano induzido pelo estresse oxidativo, principalmente no jejuno e fígado.

Palavras-chave: Saúde intestinal. Probiótico. Micotoxinas. Detoxificação. Estresse oxidativo.

SOUZA, Marielen. **Effect of *Lactobacillus* spp. on broilers chickens exposed to deoxynivalenol.** 2020. 65 p. Dissertation (Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

The aviculture contributes to an important portion of Brazil's gross domestic product due to its increasing efficiency, which highlights advances in genetics, nutrition, and sanity. The animal health can be affected by acute or chronic mycotoxins ingestion, which are metabolites produced by fungi, that contaminates 80% of the grains worldwide. Strategies to mitigate the damage induced by these compounds, such as biotransformation, can contribute to poultry production and health. The aim of this study was to evaluate the effects of the utilization of a *Lactobacillus* spp. pool in different presentations on the health of broilers fed a diet contaminated by deoxynivalenol (DON) at a concentration of 19.3 mg kg⁻¹. For this purpose broilers (n 50) with one day of age (da) were divided into five treatments: control; DON (19,3 mg kg⁻¹); viable *Lactobacillus* spp. + DON (VL+DON); heat-inactivated *Lactobacillus* spp. + DON (HIL+DON) and *Lactobacillus* spp. culture supernatant + DON (LCS+DON). The intake of the contaminated diet began at 7 da. The pool of *Lactobacillus* spp. was provided via oral gavage starting at the second da. At 14 da, the animals were euthanized and fragments of duodenum, jejunum, ileum, caecum, liver, and kidneys were collected for the histomorphometrical evaluation. The oxidative stress response was evaluated by the tests Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Nitro Blue Tetrazolium (NBT); and the antioxidant response by the tests reducing of 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS), ferric reducing ability (FRAP) and reduced glutathione (GSH). The ingestion of DON induced significantly intestinal and liver lesions compared with the other treatments, while the *Lactobacillus* spp. treatments (LT) kept similar to control. Reduction of the villi height and an increase in the intestinal crypt depth were observed in the DON group compared to control. All LT presented similar crypt depth to the control and a higher villi:crypt ratio in the duodenum and jejunum. In the ileum, only VL+DON improved the villi:crypt ratio. Ingestion of DON-contaminated diet induced an increase in goblet cells in the ileum, all LT presented a lower count in relation to the DON group. DON exposure increased intraepithelial lymphocyte count in the jejunum and ileum, however, VL+DON decreased compared to other treatments in both intestinal segments. DON raised the levels of TBARS in the jejunum, but the treatments LV+DON and HIL+DON remained similar to the control group. A reduction in GSH and ABTS levels was observed in the jejunum. In liver, DON increased NBT levels and reduced the FRAP levels the LT kept similar to the control group. In the kidney, TBARS and NBT were not altered by DON. In general, the oxidative stress response in the kidney remained similar among the treatments. The pool of *Lactobacillus* spp. used was able to improve intestinal health after DON exposure and reduce the damage induced by oxidative stress, especially in the jejunum and liver.

Key words: Intestinal health. Probiotic. Mycotoxins. Detoxification. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Vias metabólicas de desoxinivalenol em aves	17
---	----

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Figure 1 – Experimental design and sample collection illustration	39
Figure 2 – Intestinal lesion score and morphology of broilers submitted to different treatments	43
Figure 3 – Intestinal morphometry (villi height, crypt depth and villi crypt ratio) of broilers submitted to different treatments.....	44
Figure 4 – Liver lesion score and morphology of broilers submitted to different treatments.....	46

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Efeitos de desoxinivalenol (DON) na produção de radicais livres e defesa antioxidante.....	20
--	----

ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Table 1 – Composition of the experimental diets (%)	37
Table 2 – Histological criteria used to establish the intestinal and liver lesional score	40
Table 3 – Mean number and standard deviation of goblet cells in the ileum and cecum of broilers submitted to different treatments	45
Table 4 – Mean number and standard deviation of intraepithelial lymphocytes in the jejunum and ileum of broilers submitted to different treatments.....	45
Table 5 – Effects of deoxynivalenol (DON) on oxidative stress on jejunum and ileum of broiler chickens	49
Table 6 – Effects of deoxynivalenol (DON) on oxidative stress on liver and kidney of broiler chickens.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Ácido fusárico
AFLA	Aflatoxinas
DA	Days of age
DDGS	dried distillers grains with solubles
DON	Desoxinivalenol
DV	Dias de vida
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FB1	Fumonisina B1
FBs	Fumonisinias
GDP	Gross domestic product
GPDH	Glicerol-3-fosfato desidrogenase
GPx/GPx4	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reductase
HMOX	Heme oxygenase
LAMIC	Laboratório de análises micotoxicológicas
LT	Lactobacillus spp. treatments
MDA	Malondialdeído
OTA	Ocratoxina
PCR-DGGE	Polymerase Chain Reaction denaturing gradient gel electrophoresis
PIB	Produto interno bruto
PR	Paraná
RS	Rio Grande do Sul
SP	São Paulo
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
T-SOD	Superóxido dismutase total
XOR	Xantina oxidoreductase
ZEA	Zearalenona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	DESOXINIVALENOL (DON)	15
2.2	EFEITOS DE DESOXINIVALENOL NAS AVES.....	16
2.3	PROBIÓTICOS.....	21
2.3.1	Uso de Probióticos no Controle de Micotoxinas.....	21
3	REFERÊNCIAS	25
4	HIPÓTESE	31
5	OBJETIVOS	32
5.1	OBJETIVO GERAL	32
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
6	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	33
7	CONCLUSÃO	63
	ANEXOS	64
	ANEXO I.....	64
	ANEXO II	65

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio é um dos pilares da economia brasileira e em 2018 representou 21,1% do Produto interno bruto (PIB) (CEPEA/USP, 2018). O setor avícola corresponde a 1,5% do PIB, gerando aproximadamente 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos, sendo a principal atividade econômica em muitos municípios do interior do país, especialmente nas regiões Sul e Sudeste (ABPA, 2019).

Em 2018, o país produziu 13,05 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que, aproximadamente, 66,9% da produção foi destinada ao mercado interno e 33,1% à exportação. No contexto dos estados, o Paraná é destaque nacional, sendo responsável por 34,32% dos abates e 37,20% da carne de frango exportada (ABPA, 2017).

A carne é a principal fonte de proteína presente na dieta humana, sua demanda está diretamente relacionada com o crescimento da população e aumento da renda *per capita*. No Brasil, em 2017, o consumo *per capita* de carne de frango foi de 42,07 kg (ABPA, 2017). Na próxima década, estima-se um crescimento de 1,9% ao ano na renda dos latino-americanos, sendo esperado um aumento de 15% no consumo de carne de frango. Estima-se que em 2028 o consumo *per capita* na América Latina será de 34,2 kg de carne de frango, correspondendo a 42,1% do total de carne consumida (OECD/FAO, 2019).

Não há dúvidas de que a avicultura é uma atividade de extrema relevância socioeconômica. O setor é altamente tecnificado, graças aos avanços em ambiência, manejo, nutrição e melhoramento genético. Em 48 anos, a performance dos animais que era de 0,31 kg em 28 dias passou para 1,4 kg no mesmo período (ZUIDHOF et al., 2014).

Entretanto, os problemas sanitários continuam sendo um grande desafio ao setor. Neste contexto, as micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, têm grande relevância, uma vez que sua ingestão em dietas contaminadas está associada a uma redução no desempenho zootécnico, falhas vacinais e predisposição a doenças (ANDREATTA et al., 2011; ANTONISSEN et al., 2014; BROOM, 2015; GRENIER et al., 2016; YUNNUS et al., 2012b).

A contaminação de cereais por micotoxinas é um problema mundial. Estima-se que entre 60-80% das lavouras de grãos estejam contaminadas por uma ou mais micotoxinas (ESKOLA et al., 2019). Os cereais são à base da alimentação humana e

1 ração dos animais, e a contaminação por fungos toxigênicos pode ocorrer em diferentes
2 etapas da cadeia produtiva (TAHEUR et al., 2019). O controle da contaminação por
3 micotoxinas na alimentação animal é um desafio para o sistema produtivo, pois esses
4 metabólitos de fungos são resistentes ao tratamento térmico (BENKERROUM, 2016).

5 As perdas econômicas relacionadas à contaminação por aflatoxinas (AFLA),
6 fumonisinas (FBs) e desoxinivalenol (DON) variam entre \$ 418 milhões a 1,66 bilhões
7 com perdas de produtividade nas lavouras. Já na produção animal, os custos estimados
8 são de \$466 milhões com a mitigação dos efeitos tóxicos e \$ 6 milhões com perdas
9 econômicas (MAGNOLI; POLONI; CAVAGLIERI, 2019).

10 Uma das micotoxinas mais frequentes na matéria prima da alimentação animal é
11 desoxinivalenol (DON), produzida por fungos do gênero *Fusarium* spp. (CALORI-
12 DOMINGUES et al., 2007; STREIT et al., 2013). DON inibe a síntese proteica,
13 afetando principalmente células que apresentam elevada taxa de renovação, como as do
14 trato gastrointestinal e sistema imune (LEESON et al., 1995), o que resulta em maior
15 suscetibilidade a doenças (BONDY; PESTKA, 2000). O consumo de dietas
16 contaminadas com diferentes níveis de desoxinivalenol por frangos de corte causa
17 diminuição do ganho de peso diário, piora da conversão alimentar e mortalidade
18 (ANDREATTA et al., 2011). Devido aos efeitos deletérios sobre a resposta imune e
19 integridade do epitélio intestinal, seu consumo tem sido relacionado à predisposição a
20 doenças como coccidiose, colibacilose, salmonelose e enterite necrótica
21 (ANTONISSEN et al., 2014; BROOM, 2015; GRENIER et al., 2016).

22 Diferentes alternativas têm sido pesquisadas a fim de diminuir a contaminação
23 de dietas por micotoxinas ou mitigar seus efeitos tóxicos, como seleção dos grãos,
24 irradiação, tratamento com produtos químicos, utilização de agentes adsorventes,
25 detoxificação enzimática e/ou microbiológica, porém a eliminação completa destes
26 metabólitos raramente é realizada (KARLOVSKY et al., 2016).

27 A utilização de *Lactobacillus* spp. é uma possível alternativa de agente
28 adsorvente ou detoxificante de DON, capaz de reduzir os seus efeitos tóxicos na saúde
29 animal (AWAD et al., 2006; FRANCO et al., 2011; YANG et al., 2017). No entanto,
30 estudos *in vivo* que avaliem o possível efeito benéfico dos lactobacilos em reduzir a
31 toxicidade de DON em aves são escassos. Considerando que a principal forma de
32 exposição é a ingestão, é necessário especial foco para os efeitos sobre o intestino.
33 Sendo assim, mais pesquisas devem ser realizadas a fim de se compreender melhor os

- 1 efeitos tóxicos de DON sobre a saúde de frangos de corte e como a utilização de
- 2 *Lactobacillus* spp. pode atuar na mitigação dos seus danos.
- 3

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESOXINIVALENOL (DON)

As micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular (100-700 g/mol) produzidas por fungos filamentosos (STROKA; GONÇALVES, 2019), sendo descritos mais de 500 tipos (BROOM, 2015). A contaminação por fungos toxigênicos pode ocorrer em diferentes fases da produção de grãos, englobando fatores relacionados ao cultivo, colheita, armazenamento e condições ambientais, que em decorrência do aquecimento global são cada vez mais favoráveis ao crescimento fúngico, tornando a contaminação por micotoxinas um problema crescente (RUSSEL; PATERSON; LIMA, 2009).

As micotoxinas de maior relevância em todo mundo, para saúde humana e animal, são AFLA (B₁, B₂, G₁, G₂); T-2 toxinas; DON, zearalenona (ZEA), fumonisina B₁ (FB₁) e ocratoxina A (OTA) (FAO, 2018). DON é a micotoxina mais prevalente, sendo produzida principalmente por *Fusarium graminearum* e *F. culmorum*, que contaminam milho, trigo, cevada e aveia (BIOMIN, 2017; LEE; RYU, 2017, RICHARD, 2000, STREIT et al., 2013). Os fatores determinantes para que os fungos produzam micotoxinas ainda não estão totalmente esclarecidos. Entretanto, no caso de DON, sabe-se que sua produção aumenta a patogenicidade dos fungos, causando a doença denominada giberela ou fusariose da espiga do trigo (STROKA; GONÇALVES, 2019).

Estudo realizado por Rodrigues e Naehrer (2012) analisou 7.049 amostras de milho, soja/farelo de soja, trigo, *dried distillers grains with solubles* (DDGS) e rações, oriundas das Américas, Europa e Ásia, entre 2009-2011. As frequências de contaminação observadas foram: AFLA – 33%, ZEA - 45%, DON – 59%, FBs – 64% e OTA – 28%. DON foi o principal contaminante encontrado no trigo de todas as regiões estudadas. Na América do Sul, 53% das amostras estavam contaminadas em média com 0,947 mg kg⁻¹, e o nível máximo de contaminação foi de 2,52 mg kg⁻¹.

Nos estados do Paraná e Rio Grande do Sul os níveis de contaminação por DON nas safras de 2006, 2007 e 2008 em trigo grão destinados à alimentação humana variaram entre 0,089 a 1,59 mg kg⁻¹, com uma contaminação média de 0,32 mg kg⁻¹ (SANTOS et al., 2011). Já nas safras de 2008 e 2009, 66,4% das amostras de trigo

1 paranaense foram positivas para DON e a contaminação média foi de 1,89 mg kg⁻¹
2 (SANTOS et al., 2013).

3 A contaminação por múltiplas micotoxinas é outro problema frequentemente
4 observado. Streit et al. (2013) realizaram a detecção de micotoxinas em 83 amostras de
5 ração ou em suas matérias primas oriundas de diversos países (Hungria, Áustria,
6 Dinamarca, Bélgica, Itália, Noruega, Rússia, Reino Unido, Ucrânia, Brasil, Canadá,
7 Estados Unidos e Austrália). Todas as amostras apresentaram contaminação múltipla,
8 variando entre sete a 69 micotoxinas em uma mesma amostra. As fusariotoxinas foram
9 as mais prevalentes e DON apresentou 89% de frequência, com uma concentração
10 mediana de 0,122 mg kg⁻¹.

11 Os níveis máximos de DON recomendados na ração de frangos no Brasil variam
12 de acordo com a categoria, sendo 0,2 mg kg⁻¹ na fase inicial, 0,5 mg kg⁻¹ no crescimento
13 e 1 mg kg⁻¹ para frangos de corte na fase final, matrizes e poedeiras (LAMIC, 2018). No
14 entanto, no Brasil não há uma legislação que regulamente os níveis de contaminação por
15 micotoxinas nos produtos destinados ao consumo animal. Na União Europeia, por
16 exemplo, o nível máximo recomendado na ração final de frangos de corte é de 5 mg kg⁻¹
17 de ração (EC, 2006).

18

19 2.2 EFEITOS DE DESOXINIVALENOL NAS AVES

20

21 Em relação à suscetibilidade aos efeitos tóxicos de DON, as aves são
22 consideradas uma das espécies mais tolerantes (MARESCA, 2013). Este fato é
23 justificado pelo baixo grau de absorção e distribuição sistêmica desta micotoxina nos
24 tecidos, uma vez que a metabolização ocorre principalmente no intestino e fígado,
25 reduzindo a quantidade de DON presente na circulação sistêmica. Além disso, a
26 interação com a microbiota tanto no papo quanto no intestino é outro fator crucial na
27 diminuição da quantidade de DON disponível para absorção (GHAREEB et al., 2014;
28 MARESCA, 2013). Estudo de toxicocinética evidenciou que a biodisponibilidade oral
29 nas aves é de aproximadamente 20%, e que as maiores concentrações de DON são
30 encontradas no intestino delgado, fígado (principalmente na bile) e rins (GUERRE,
31 2015).

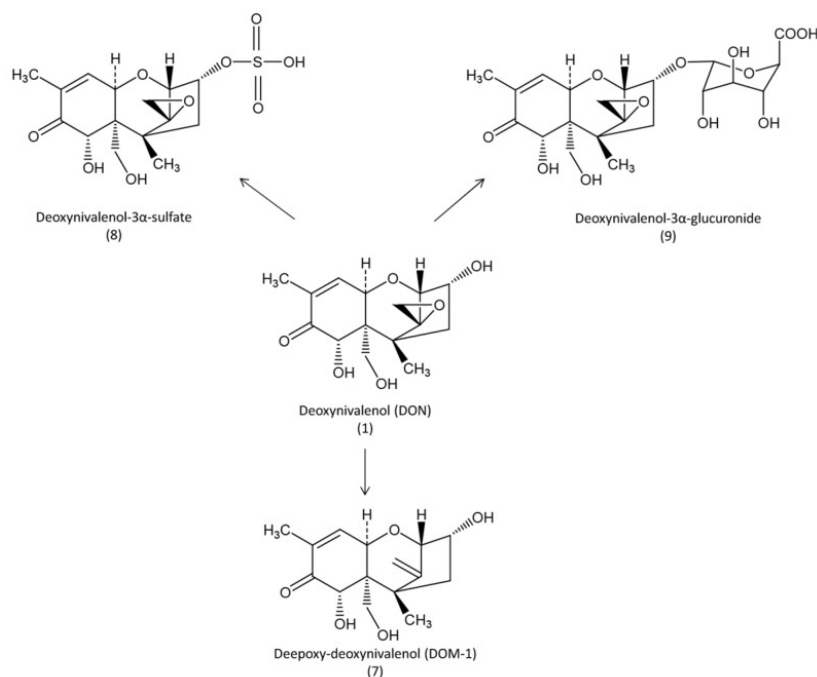
32 A principal via de metabolização em aves é a hepática, por meio de sulfonação,
33 processo que aumenta a solubilidade de compostos tóxicos, facilitando sua excreção

1 pela bile e urina. A exposição prolongada ao DON leva ao aumento dos níveis das
 2 enzimas hepáticas responsáveis pela metabolização (GUERRE, 2015). Em mamíferos, a
 3 metabolização ocorre principalmente pela de-epoxidação, resultando no metabólito
 4 deepoxi-desoxinivalenol (DÄNICKE; BREZINA, 2013; GUERRE, 2015). O principal
 5 metabólito de DON em galinhas é o DON-3 α -sulfato (SCHWARTZ-ZIMMERMANN
 6 et al., 2015).

7

8

Figura 1- Vias metabólicas de desoxinivalenol em aves.



9

10 Fonte: Guerre, 2015.

11

12 Apesar da aparente tolerância das aves ao DON, diversos efeitos negativos têm
 13 sido relacionados ao seu consumo em frangos, como a diminuição no ganho de peso
 14 diário (apresentando correlação positiva com a quantidade de micotoxina fornecida),
 15 piora da conversão alimentar, aumento da mortalidade, aumento do peso do fígado e
 16 diminuição da eficiência produtiva (ANDRETTA et al., 2011).

17 Alterações na morfologia intestinal também têm sido associadas ao nível de
 18 contaminação da dieta (YUNUS et al., 2012; AWAD et al. 2011). O principal segmento
 19 intestinal afetado pelos efeitos tóxicos de DON é o intestino delgado, especialmente
 20 duodeno e jejuno (AWAD et al., 2007). Aves expostas a dieta contaminada por DON (5
 21 mg kg⁻¹) apresentaram diminuição do peso absoluto e relativo do intestino delgado, bem
 22 como da altura e largura das vilosidades duodenais (AWAD et al., 2006a). Redução da

1 altura das vilosidades e aumento da profundidade de criptas em duodeno e jejuno
2 também foi relatado em frangos após ingestão de DON (10 mg kg⁻¹) (WU et al., 2018).

3 Wang e Hogan (2019) avaliaram os efeitos de uma dieta contaminada com DON
4 (11,4 mg kg⁻¹) sobre o desempenho e morfometria intestinal em diferentes fases do
5 crescimento de frangos de corte. Os parâmetros zootécnicos só foram reduzidos quando
6 a exposição ocorreu entre 22-34 dias de vida (dv). Na fase inicial (15-21 dv) houve
7 diminuição na altura de vilosidades em jejuno e íleo; aos 22-34 dv apenas o jejuno foi
8 afetado, apresentando menor altura de vilos e maior relação vilos:criptas. Quando
9 expostos ao longo de todo o ciclo (1-34 dv), a consequência foi redução da altura das
10 vilosidades e criptas no íleo. Os autores concluíram que frangos desafiados com DON
11 na fase inicial conseguem recuperar as perdas no desempenho, sendo os animais em fase
12 de crescimento mais sensíveis aos efeitos deletérios sob a performance. #

13 A ingestão de dietas contaminadas com DON (5-10 mg kg⁻¹), além de ser
14 associada a menor área de absorção intestinal, diminuição na função e expressão dos
15 transportadores de glicose, frutose e aminoácidos, falhas no desempenho, também
16 propicia uma maior concentração de nutrientes no intestino delgado, o que pode
17 predispor a quadros de disbiose (GHAREEB et al., 2015). Bacteroidaceae,
18 Ruminococcaceae, Lachnospiraceae e Clostridiaceae são as principais famílias
19 bacterianas presentes no ceco de frangos, entretanto DON é capaz de alterar essa
20 relação, diminuindo os gêneros *Oscillospira*, *Clostridium*, *Ruminococcaceae* e
21 aumentando o gênero *Clostridiales* (LUCKE et al., 2018; AGUZEY et al., 2019).

22 Alterações na barreira intestinal também têm sido atribuídas a ingestão de DON,
23 como resultado de mudanças na permeabilidade paracelular (AWAD et al., 2019), na
24 menor expressão dos genes claudina-1, ocludina (WU et al., 2018) e mucina
25 (ANTONISSEN et al., 2015). Entretanto, um aumento no número de células
26 caliciformes também foi descrito (WANG; HOGAN, 2019). O aumento da
27 permeabilidade intestinal facilita a translocação de microrganismos, evento que foi
28 associado a maior expressão de mRNA TLR 4 em duodeno e jejuno após ingestão de
29 dieta contaminada por DON (7,54 mg kg⁻¹ por 3 semanas) (OSSEALAERE et al.,
30 2013). Efeitos citotóxicos em linfócitos intestinais (AWAD et al., 2014), bem como
31 modulação da resposta imune e diminuição da resposta vacinal para doença de
32 Gumboro e Newcastle foram relacionados a maior suscetibilidade a doenças em
33 frangos expostos ao DON (AWAD et al., 2013).

1 Perus são afetados de modo similar a frangos quando submetidos à dieta multi-
2 contaminada com micotoxinas (DON 6,8-13,6 mg kg⁻¹, 15-acetyl-DON 0,6-1,3 mg kg⁻¹
3 e ZEA 0,4-0,7 mg kg⁻¹), apresentando diminuição na população de linfócitos TCD4⁺ e
4 TCD8⁺ e aumento na IgA biliar (CHOWDHURY et al., 2005). Deste modo, também
5 nesta espécie a ingestão de fusariotoxinas atua negativamente sobre a resposta imune,
6 podendo tornar os animais mais suscetíveis a infecções.

7 A formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um evento fisiológico,
8 porém quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade
9 antioxidante, estabelece-se o estresse oxidativo, que pode desencadear diferentes
10 respostas como aumento da proliferação celular, apoptose ou necrose (HALLIWEL,
11 2007). A exposição ao DON, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* pode elevar os
12 níveis de EROs e induzir o estresse oxidativo nos tecidos (GHAREEB et al., 2015). A
13 Tabela 1 apresenta dados relacionados à interação entre DON e a resposta ao estresse
14 oxidativo em frangos.

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **Tabela 1-** Efeitos de desoxinivalenol (DON) na produção de radicais livres e defesa
 2 antioxidante

Espécie	Micotoxina; nível de contaminação e duração	Órgão	Efeito	Referência
Frangos <i>in vitro</i>	DON 0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL 24, 48 e 72 h	Linfócitos	DON aumenta MDA em todas as concentrações em 24 h 48-72 h apenas 1 µg/mL aumenta MDA	Lautert et al. (2014)
Frangos <i>in vitro</i>	DON diferentes concentrações 100, 500, 1000, e 2000 ng/ml 24 h	Fibroblastos embrionários de galinha (DF-1 células)	Aumenta MDA (500, 1000 e 2000 ng/ml) Reduz GSH (500, 1000 e 2000 ng/ml) Reduz SOD (100, 500, 1000 e 2000 ng/ml)	Li et al. (2014)
Frangos <i>in vitro</i>	DON 0-50 µg/mL 48 h	Linfócitos esplênicos	Aumenta os níveis de EROs	Ren et al. (2015)
Frangos	DON 4,6 mg kg ⁻¹ 2 sem	Íleo	Aumenta mRNA HMOX	Antonissen et al. (2015)
Frangos	DON 10 mg kg ⁻¹ 5 sem	Fígado	Não altera TBARS	Awad et al. (2012)
Frangos	DON 10 mg kg ⁻¹ 5 sem	Jejuno	Aumenta TBARS	Awad et al. (2014)
Frangos	DON e ZEA 3,4 mg kg ⁻¹ 2 sem	Fígado	Aumenta MDA Reduz GPx	Borutova et al. (2008)
		Rim	Aumenta MDA	
	DON e ZEA 8,2 e 8,3 mg kg ⁻¹ 2 sem	Fígado	Aumenta MDA Reduz GPx	
Frangos	AFLA 102,08 mg kg ⁻¹ ; ZEA 281,92 mg kg ⁻¹ ; FUMO 5.874,38 mg kg ⁻¹ ; DON 2.038,96 mg kg ⁻¹ 6 sem	Soro	Aumenta MDA Reduz T-SOD	Jiang et al. (2014)
Frangos	DON 7,54 mg kg ⁻¹ 3 sem	Fígado	Reduz mRNA HIF1, HMOX Aumenta mRNA XOR	Ossealaere et al. (2013)
		Jejuno	Aumenta mRNA HMOX e XOR	
Frangos	<i>Baixo:</i> 0,23 mg kg ⁻¹ toxina T-2 e 4,96 mg/kg DON <i>Médio:</i> 1,21 mg kg ⁻¹ toxina T-2 e 12,38 mg/kg DON <i>Alto:</i> 2,42 mg kg ⁻¹ toxina T-2 e 24,86 mg kg ⁻¹ DON 1 sem	Fígado	Aos 3 e 7 dias reduz MDA (níveis baixo e alto) Aos 3 dias aumenta mRNA GAPDH (níveis médio e alto) Aos 3 dias aumenta mRNA GPx4 (nível alto)	Pelyhe et al. (2018)
Frangos	DON 10 mg kg ⁻¹ 6 sem	Soro	Reduz SOD Não altera GSH-Px e MDA	Yang et al. (2017)
		Jejuno	Não altera SOD Aumenta MDA	

3 EROs: TBARS- substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA- malondialdeído; T-SOD- superóxido
 4 dismutase total; XOR- xantina oxidoreductase; Defesa antioxidante: GSH- glutadiona redutase;
 5 GPx/GPx4- glutadiona peroxidase; HMOX- heme oxigenase; GPDH- Glicerol-3-fosfato desidrogenase.
 6 Sem.- semana; hs- horas.

7

8

9

2.3 PROBIÓTICOS

O termo probiótico deriva do latim e grego e significa “a favor da vida”. São definidos como microrganismos que administrados em doses adequadas conferem algum benefício ao hospedeiro (HOSSAIN; SADEKUZZAMAN; HA, 2017). O probiótico ideal deve ser apatogênico, atóxico, tolerar o suco gástrico, aderir ao epitélio intestinal e persistir nele, além de produzir substâncias com ação antimicrobiana (ANGELAKIS, 2017).

Diferente dos prebióticos, que são oligossacarídeos não digestíveis que atuam estimulando o crescimento de bactérias benéficas da microbiota intestinal (BORDA-MOLINA; SEIFERT; CAMARINHA-SILVA, 2018), os probióticos atuam no trato gastrintestinal por meio dos seguintes mecanismos: estímulo do sistema imune, exclusão do modo competitivo (pela colonização da mucosa que leva a diminuição do número de sítios de ligação livres, competição por nutrientes e produção de bacteriocinas), potencialização da atividade de enzimas digestivas e produção de substâncias que neutralizam enterotoxinas (M'SADEQ et al., 2015).

Neste contexto destaca-se o uso de bactérias ácido lácticas. Microrganismos benéficos como *Lactobacillus* spp. podem atuar por diferentes mecanismos frente a agentes patogênicos, seja por colonização do intestino e redução dos sítios de ligação ou produção de metabólitos com ação antimicrobiana e competição por nutrientes (HOSSAIN; SADEKUZZAMAN; HA, 2017). Nos frangos, *L. reuteri*, *L. salivarius* e *L. animalis* são as espécies predominantes, sendo que *L. reuteri* tem potencial de produzir reuterina, que é um metabólito com ação antimicrobiana comprovada frente à *Salmonella* spp., *E. coli* e *Campylobacter* spp. (EDENS, 2003). Efeitos benéficos da ingestão de *Lactobacillus* spp. (5,8 log UFC/g ração) por seis semanas foram relatados em frangos de corte que apresentaram aumento da relação vilosidade/cripta intestinal (OLNOOD et al., 2015).

2.3.1 Uso de Probióticos no Controle de Micotoxinas

A contaminação dos alimentos por micotoxinas é um fenômeno multifatorial, envolvendo fatores pré-colheita (temperatura e umidade do ambiente, suscetibilidade da planta a infecção por fungos toxigênicos, manejo sanitário da lavoura), durante a colheita (umidade dos grãos) e pós-colheita (secagem prévia ao armazenamento,

1 controle fúngico nos silos) (CAST, 2003). Estes metabólitos interferem tanto na saúde
2 animal, quanto humana. As condições ambientais são fatores que não podem ser
3 controlados, por isso os níveis de contaminação variam tanto na mesma região em
4 diferentes períodos. Estudos indicam que as mudanças climáticas decorrentes do
5 aquecimento global tendem a aumentar os problemas de contaminação por micotoxinas
6 (RUSSELL; PATERSON; LIMA, 2010).

7 No Brasil, o nível médio de contaminação de trigo por DON no ano de 2005
8 relatado nos estados de São Paulo (SP), Paraná (PR) e Rio Grande do Sul (RS) foi de
9 $0,332 \text{ mg kg}^{-1}$ (CALORI-DOMINGUES et al., 2007). Tralamazza et al. (2016)
10 analisaram 50 amostras de trigo recém-colhido durante a safra de 2012 no Paraná, sendo
11 que 98% das amostras foram positivas, e a contaminação variou entre $0,183\text{-}0,894 \text{ mg}$
12 kg^{-1} . Outro estudo avaliou a contaminação por DON entre 2012-2013 em 57 amostras
13 de milho do PR; 58% foram positivas quanto à presença da micotoxina a uma
14 concentração média de $0,184 \text{ mg kg}^{-1}$ (OLIVEIRA et al., 2017). Vale ressaltar que os
15 farelos de milho e soja são base da formulação da ração de frangos de corte no Brasil.

16 Considerando que a contaminação por micotoxinas é um problema atual na
17 produção animal, diversas alternativas têm sido propostas para a diminuição dos seus
18 efeitos negativos. O uso de adsorventes orgânicos ou inorgânicos (orgânicos: parede
19 celular de levedura; inorgânicos: betonitas e alumínio-silicatos; ou sintéticos: polímeros
20 de colestiramina) está entre as principais estratégias. Estes compostos atuam por meio
21 da ligação com as micotoxinas presentes na ração de forma que passem pelo trato
22 gastrointestinal sem serem absorvidas. Também agentes bio-transformantes como
23 bactérias, fungos ou enzimas podem ser utilizados, transformando as micotoxinas em
24 metabólitos não tóxicos ou menos tóxicos (OLIVEIRA et al., 2014; VILA-DONAT et
25 al., 2018).

26 A identificação de microrganismos com capacidade de detoxificação de
27 micotoxinas é um desafio. Foi comprovado que a exposição prévia com dietas
28 contaminadas por DON (10 mg kg^{-1}), incubação em meio enriquecido (DON 100
29 $\mu\text{g/mL}$) e utilização da técnica de PCR-DGGE (Polymerase Chain Reaction *denaturing*
30 *gradient gel electrophoresis*), melhora o índice de sucesso no processo de isolamento de
31 microrganismos com habilidade de detoxificar DON em amostras de conteúdo intestinal
32 de frangos de corte. Os isolados com essa característica pertenciam principalmente aos
33 gêneros *Clostridiales*, *Anaerofilum*, *Collinsella* e *Bacillus* (YU et al., 2010).

1 Diferentes estudos utilizando modelos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* demonstraram
2 efeitos benéficos de bactérias ácido lácticas frente à exposição à micotoxinas. Essa
3 habilidade foi relacionada à capacidade de interação com estes compostos, diminuindo
4 sua absorção. Gratz et al. (2005) verificaram *in vitro* que a mistura de *Lactobacillus*
5 *rhamnosus* e *Propionibacterium* spp. neutralizou entre 38-47% de aflatoxina B1 (5 µM)
6 em solução e 25% de aflatoxina B1 (5 µM) em modelo *ex vivo*. Fazeli et al. (2009)
7 utilizaram *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. casei* obtendo entre 25 a 61% de redução na
8 concentração de aflatoxina B1 (5 µg/ml) em solução. El-Nezami et al. (2002)
9 verificaram *in vitro* a capacidade de cepas viáveis e inativadas pelo calor de *L.*
10 *rhamnosus* (duas cepas) e *Propionibacterium* (uma cepa) em neutralizar micotoxinas
11 produzidas por fungos do gênero *Fusarium* spp., dentre elas DON (20 µg/ml), obtendo
12 resultados entre 18-93% de diminuição. Na comparação entre as cepas viáveis e
13 inativadas quanto à capacidade de redução das micotoxinas, apenas uma das cepas de *L.*
14 *rhamnosus* apresentou resultados significativos, utilizando microrganismos viáveis.
15 Franco et al. (2011) isolaram cepas de *L. plantarum* de amostras de trigo capazes de
16 inibir o crescimento de *F. graminearum* e remover DON *in vitro*, sendo que essa
17 redução foi observada tanto pelas bactérias viáveis, quanto pelas inativadas pelo calor.

18 Maidana et al. (2017) verificaram em modelo de explante de jejuno de suínos o
19 efeito protetor sobre a integridade das vilosidades intestinais do sobrenadante da cultura
20 de duas cepas de *L. plantarum* frente ao desafio com DON (10µM). Awad et al. (2006b)
21 desafiaram frangos de corte com dieta contaminada com DON (10 mg kg⁻¹) e DON +
22 *Eubacterium* spp. DSM 11798 (Biomim®). O principal efeito negativo do desafio com
23 DON foi à diminuição da altura e largura das vilosidades no duodeno e jejuno,
24 entretanto, o fornecimento do probiótico surtiu efeito protetor sobre o grupo desafiado
25 com DON + *Eubacterium* spp.

26 Yang et al. (2017) avaliaram *in vitro* a capacidade antioxidante de uma cepa de
27 *L. plantarum* isolada do trato gastrointestinal de uma ave saudável. Posteriormente,
28 realizaram ensaio *in vivo*, em que frangos de corte receberam DON (10 mg kg⁻¹) ou o
29 probiótico via ração (1x10⁹ UFC/kg ração). Não foram observadas diferenças na
30 performance dos animais, entretanto, constatou-se que a suplementação com probiótico
31 diminuiu o estresse oxidativo na mucosa do jejuno e aumentou a expressão da proteína
32 de junção claudina-1 quando comparados ao grupo DON, concluindo que o probiótico
33 foi eficaz na ação antioxidante e de proteção da integridade da barreira intestinal.

1 Diversos estudos descrevem os efeitos tóxicos de DON em frangos de corte,
2 entretanto, a avaliação de índices zootécnicos destaca-se como principal objetivo. Dados
3 relacionados aos efeitos sobre a sanidade das aves ou que enfoquem a toxicidade
4 intestinal ou a resposta ao estresse oxidativo são escassos. Deste modo, a busca por
5 estratégias para mitigar os efeitos negativos tem tido interesse crescente. A utilização de
6 bactérias probióticas é uma alternativa viável para diminuição da toxicidade de DON
7 em frangos de corte. Estes microrganismos, além de reduzirem os efeitos tóxicos de
8 DON, são capazes de modular a saúde intestinal e a resposta oxidativa, no entanto, é
9 necessário estabelecer as melhores cepas e formas de apresentação (viáveis e/ou
10 inativadas). Em conclusão, apesar de existirem alternativas para reduzir os efeitos
11 tóxicos de DON em frangos, é importante que mais pesquisas sejam realizadas, a fim de
12 ampliar as formas de mitigação, melhorar a eficiência de detoxificação e reduzir custos.
13 Deve-se considerar também que parte dos produtos utilizados como adsorventes são
14 oriundos de fontes não renováveis, como argilas e rochas.
15

1 3. REFERÊNCIAS

- 2
- 3 ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Brazilian Chicken. Nossa história.**
4 Disponível em: <<http://www.brazilianchicken.com.br/pt/poultry-industry/background>>.
5 Acesso em: 28/11/2019.
- 6 ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2017.** 08 Carne de frango.
7 p 10-20.
- 8 AGUZEY, H. A.; GAO, Z.; WU, H.; CHENG, G.; WU, Z.; CHEN, J. The effects of
9 deoxynivalenol (DON) on the gut microbiota, morphology and immune system of chicken – A
10 Review. **Annals of Animal Science**, v. 19, n. 2, p. 305-318, 2019.
- 11 ANDRETTA, I.; KIPPER, M.; LEHNEN, C. R.; HAUSCHILD, L.; VALE, M. M.; LOVATTO
12 P. A. Meta-analytical study of productive and nutritional interactions of mycotoxins in broilers.
13 **Poultry Science**, v.90, p.1934–1940, 2011.
- 14 ANGELAKIS, E. Weight gain by gut microbiota manipulation in productive animals.
15 **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 162-170, 2017.
- 16 ANTONISSEN, G.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.;
17 HAESEBROUCK, F.; TIMBERMONT, L.; VERLINDEN, M.; JANSSENS, G. P. J.;
18 EECKHAUT, V.; EECKHOUT, M.; DE SAEGER, S.; HESSENBERGER, S.; MARTEL, A.;
19 CROUBELS, S. The mycotoxin deoxynivalenol predisposes for the development of *Clostridium*
20 *perfringens*-induced Necrotic Enteritis in broiler chickens. **PLOS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1-8, 2014.
- 21 ANTONISSEN, G.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; JANSSENS,
22 G. P.; DE BAERE, S.; MOUNTZOURIS, K. C.; SU, S.; WONG, E. A.; DE MEULENAER, B.;
23 VERLINDEN, M.; DEVREESE, M.; HAESEBROUCK, F.; NOVAK, B.; DOHNAL, I.;
24 MARTEL, A.; CROUBELS, S. Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic
25 component of intestinal barrier in broiler chickens. **Journal of Agricultural and Food**
26 **Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 1-44, 2015.
- 27 AWAD, W. A.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E.; ZENTEK, J. Effects of feeding
28 deoxynivalenol contaminated wheat on growth performance, organ weights and histological
29 parameters of the intestine of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal**
30 **Nutrition**, v. 90, n. 1-2, p. 32-37, 2006a.
- 31 AWAD, W. A.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E.; GHAREEB, K.; ZENTEK, J. Effect of
32 addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on
33 performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. **Poultry Science**,
34 v. 85, p. 974-979, 2006b.
- 35 AWAD, W. A.; GHAREEB, K.; DADAK, A.; GILLE, L.; STANIEK, K.; HESS, M.; BOHM,
36 J. Genotoxic effects of deoxynivalenol in broiler chickens fed low-protein feeds. **Poultry**
37 **Science**, v. 91, n. 3, p. 550-555, 2012.
- 38 AWAD, W. A.; GHAREEB, K.; DADAK, A.; HESS, M.; BÖHM, J. Single and Combined
39 Effects of deoxynivalenol mycotoxin and a microbial feed additive on lymphocyte DNA
40 damage and oxidative stress in broiler chickens. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2014.
- 41 AWAD, W. A.; RAZZAZI-FAZELI, E.; BOHM, J.; ZENTEK, J. Influence of deoxynivalenol
42 on the D-glucose transport across the isolated epithelium of different intestinal segments of
43 laying hens. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 91, n. 5-6, p. 175-180,
44 2007.
- 45 AWAD, W. A.; RUHNAU, D.; HESS, C.; DOUPOVEC, B.; SCHATZMAYR, D.; HESS, M.
46 Feeding of deoxynivalenol increases the intestinal paracellular permeability of broiler chickens.
47 **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 7, p. 2057-2064, 2019.

- 1 AWAD, W. A.; VAHJEN, W.; ASCHENBACH, J. R.; ZENTEK, J. A diet naturally
2 contaminated with the fusarium mycotoxin deoxynivalenol (DON) downregulates gene
3 expression of glucose transporters in the intestine of broiler chickens. **Livestock Science**, v.
4 140, n. 1, p. 72-79, 2011.
- 5 AWAD, W.; GHAREEB, K.; BOHM, J.; ZENTEK, J. The toxicological impacts of the
6 fusarium mycotoxin, deoxynivalenol, in poultry flocks with special reference to
7 immunotoxicity. **Toxins**, v. 5, p. 912-925, 2013.
- 8 Benkerroum, N. Mycotoxins in dairy products: A review. **International Dairy Journal**, v. 62,
9 p. 63-75, 2016.
- 10 BIOMIN. **RESULTADOS REGIONAIS DA OCORRÊNCIA MUNDIAL DE**
11 **MICOTOXINAS ATÉ SETEMBRO 2017.** Disponível em: <
12 [https://www.biomin.net/pt/blog-posts/resultados-regionais-da-ocorrencia-mundial-de-](https://www.biomin.net/pt/blog-posts/resultados-regionais-da-ocorrencia-mundial-de-micotoxinas-ate-setembro-2017/)
13 [micotoxinas-ate-setembro-2017/](https://www.biomin.net/pt/blog-posts/resultados-regionais-da-ocorrencia-mundial-de-micotoxinas-ate-setembro-2017/)>. Acesso em: 30/07/2019.
- 14 BONDY, G. S.; PESTKA, J. J. Immunomodulation by fungal toxins. **Journal of Toxicology**
15 **and Environmental Health**, v. 3, p. 109–143, 2000.
- 16 BORDA-MOLINA, D.; SEIFERT, J.; CAMARINHA-SILVA, A. Current perspectives of the
17 chicken gastrointestinal tract and its microbiome. **Computational and Structural**
18 **Biotechnology Journal**, v.16, p.131–139, 2018.
- 19 BORUTOVA, R.; FAIX, S.; PLACHA, I.; GRESAKOVA, L.; COBANOVA, K.; LENG, L.
20 Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in
21 broilers. **Archives of Animal Nutrition**, v. 62, n. 4, p. 303-312, 2008.
- 22 BROOM, L. Mycotoxins and the intestine. **Animal Nutrition**, v.1, p. 262-265, 2015.
- 23 CALORI-DOMINGUES, M. A.; ALMEIDA, R. R.; TOMIWAKA, M. M.; GALLO, C. R.;
24 GLORIA, E. M.; DIAS, C. T. S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado
25 utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 181-185, 2007.
- 26 CAST - COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY. **Mycotoxins:**
27 **Risks in plant, animal, and human systems.** Task Force Report
28 No. 139. Ames, 2003.
- 29 CEPEA – CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA
30 (ESALQ/USP). **PIB do Agronegócio Brasil. Participação do Agronegócio no PIB do Brasil**
31 **(em %).** Disponível em: <[https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-](https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx)
32 [brasileiro.aspx](https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx)>. Acesso em: 28/11/2019.
- 33 CHOWDHURY, S. R.; SMITH, T. K.; BOERMANS, H. J.; WOODWARD, B.
34 IMMUNOLOGY, HEALTH, AND DISEASE: Effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on
35 hematology and immunology of turkeys. **Poultry Science**, v.84, p.1698–1706, 2005.
- 36 DÄNICKE, S.; BREZINA, U. Kinetics and metabolism of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol
37 in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. **Food**
38 **and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 58-75, 2013.
- 39 EC - European Commission, 2006. Commission Recommendation 576/2006/EC of 17
40 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2
41 and fumonisins in products intended for animal feeding. **Official Journal of the European**
42 **Union L 229**, 7
- 43 EDENS, FW. An alternative for antibiotic se in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de**
44 **Ciência Avícola.** Campinas, v. 5, n. 2, p. 75-97, 2003.
- 45 EL-NEZAMIY, H. S.; CHREVATIDISY, A.; AURIOLA, S.; SALMINEN, S.; MYKKANEN,
46 H. Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and
47 *Propionibacterium*. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n.7, p. 680-686, 2002.

- 1 EMBRAPA. **Embrapa suínos e aves. Estatísticas/Desempenho da produção.** Disponível em:
2 <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>. Acesso em: 13/09/2018.
- 3 ESKOLA, M.; KOS, G.; ELLIOTT, C. T.; HAJŠLOVÁ, J.; MAYAR, S.; KRŠKA, R.
4 Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO
5 estimate' of 25. **Food Science and Nutrition**, v. 10, p. 1-17, 2019.
- 6 FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Mycotoxins of world-wide**
7 **Importance.** Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y1390e/y1390e04.htm>>, acesso
8 em:02/06/2018.
- 9 FAZELI, M. R.; HAJIMOHAMMADALI, M.; MOSHKANI, A.; SAMADI, N.; JAMALIFAR,
10 H.; KHOSHAYAND, M. R.; VAGHARI, E.; POURAGAH, S. Aflatoxin B₁ binding capacity
11 of autochthonous strains of lactic acid bacteria. **Journal of Food Protection**, v.72, n.1, p. 189-
12 192, 2009.
- 13 FRANCO, T. S.; GARCIA, S.; HIROOKA, E. Y.; ONO, Y. S.; DOS SANTOS, J. S. Lactic acid
14 bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. **Journal**
15 **of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 739-748, 2011.
- 16 GHAREEB, K., AWAD, W. A., BÖHM, J.; ZEBELI, Q. Impacts of the feed contaminant
17 deoxynivalenol on the intestine of
18 monogastric animals: poultry and swine. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, p. 327-337,
19 2015.
- 20 GRATZ, S.; MYKKANEN, H.; EL-NEZAMI, H. Aflatoxin B₁ binding by a mixture of
21 *Lactobacillus* and *Propionibacterium*: *in vitro* versus *ex vivo*. **Journal of Food Protection**,
22 v.68, n.11, p. 2470–2474, 2005.
- 23 GRENIER, B.; DOHNAL, I.; SHANMUGASUNDARAM, R.; EICHER, S. D.; SELVARAJ, R.
24 K.; SCHATZMAYR, G.; BERTRAND, T. J. Susceptibility of broiler chickens to coccidiosis
25 when fed subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins - Special emphasis on the
26 immunological response and the mycotoxin interaction. **Toxins**, n 8, v.231, p. 1-22, 2016.
- 27 GUERRE, P. Fusariotoxins in avian species: toxicokinetics, metabolism and
28 persistence in tissues. **Toxins**, v. 7, p. 2289-2305, 2015.
- 29 HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35,
30 n. 5, p. 1147-1150, 2007.
- 31 HOSSAIN, M. I; SADEKUZZAMAN, M; HA, S. Probiotics as potential alternative biocontrol
32 agents in the agriculture and food industries: A review. **Food Research International**, v.100, p
33 63–73, 2017.
- 34 JIANG, S. Z.; LI, Z.; WANG, G. Y.; YANG, Z. B.; YANG, W. R.; ZHANG, G. G.; WU, Y. B.
35 Effects of *Fusarium* mycotoxins with yeast cell wall absorbent on hematology, serum
36 biochemistry, and oxidative stress in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry**
37 **Research**, v. 23, n. 2, p. 165-173, 2014.
- 38 KARLOVSKY, P.; SUMAN, M.; BERTHILLER, F.; MEESTER, J.; EISENBRAND, G.;
39 PERRIN, I.; OSWALD, I. P.; SPEIJERS G.; CHIODINI, A.; RECKER, T.; DUSSORT, P.
40 Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination.
41 **Mycotoxin Research**, v. 32, p. 179–205, 2016.
- 42 LAMIC – Laboratório de Análises Micotoxicológicas. **Legislação Brasil.** Disponível em: <
43 <https://www.lamic.ufsm.br/site/legislacao/legislacao-brasil>>. Acesso em: 19/11/2018.
- 44 LAUTERT, C.; FERREIRO, L.; WOLKMER, P.; PAIM, F. C.; DA SILVA, C. B.; JAQUES, J.
45 A. S.; LOPES, S. T. A.; SANTURIO, J. M. Individual *in vitro* effects of ochratoxin A,
46 deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and acetylcholinesterase in lymphocytes of
47 broiler chickens. **Springer Plus**, v. 3, n. 1, p. 506-513, 2014.

- 1 LEE, H. J.; RYU, D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food
2 products: public health perspectives of their co-occurrence. **Journal of Agricultural and Food**
3 **Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7034-7051, 23/08/2017 2017. ISSN 0021-8561.
- 4 LEESON, S.; DIAZ, G.; SUMMERS, J. D. **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**.
5 University Books, Guelph, Ontario, Canada. 1995.
- 6 LI, D.; YE, Y.; LIN, S.; DENG, L.; FAN, X.; ZHANG, Y.; DENG, X.; LI, Y.; YAN, H.; MA,
7 Y. Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells *in vitro*: cell-cycle arrest,
8 oxidative stress, and apoptosis. **Environmental Toxicologic Pharmacology**, v. 37, n. 1, p. 141-
9 149, 2014.
- 10 LUCKE, A.; BÖHM, J.; ZEBELI, Q.; METZLER-ZEBELI, B. U. Dietary deoxynivalenol
11 contamination and oral lipopolysaccharide challenge alters the cecal microbiota of broiler
12 chickens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 804, 2018.
- 13 MAGNOLI, A. P.; POLONI, V. L.; CAVAGLIERI, L. Impact of mycotoxin contamination in
14 the animal feed industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 99-108, 2019.
- 15 MAIDANA, L.G.; GEREZ, J.; PINHO, F.; GARCIA, S.; BRACARENSE, A.P.F.L.
16 *Lactobacillus plantarum* culture supernatants improve intestinal tissue exposed to
17 deoxynivalenol. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.69, p. 666–671, 2017.
- 18 MARESCA, M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-
19 associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. **Toxins**, v. 5, p. 784-820, 2013.
- 20 M'SADEQ, S. A.; WU, S.; SWICK, R. A.; CHOCT, M. Towards the control of necrotic
21 enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. **Animal**
22 **Nutrition**, v.01, p.1-11, 2015.
- 23 OLIVEIRA, C. A.F.; CORASSIN, C. H.; CORRÊA, B.; OSWALD, I. P. Animal health:
24 mycotoxins. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, v. 01, p. 358-377, 2014.
- 25 OLIVEIRA, M. S.; ROCHA, A.; SULYOK, M.; KRŠKA, R.; MALLMANN, C. A. Natural
26 mycotoxin contamination of maize (*Zea mays L.*) in the South region of Brazil. **Food Control**,
27 v. 73, p. 127-132, 2017.
- 28 OLNOOD, C. G.; BESKI, S. S. M.; CHOCT, M.; IJI, PAUL. A. Novel probiotics: their effects
29 on growth performance, gut development, microbial community and activity of broiler
30 chickens. **Animal Nutrition**, v.01, p.184–191, 2015.
- 31 ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT/FOOD AND
32 AGRICULTURE ORGANIZATION - OECD/FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-**
33 **2028**. Editora: OECD Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.
34 2019
- 35 OSSELAERE, A.; SANTOS, R.; HAUTEKIET, V.; DE BACKER, P.; CHIERS, K.;
36 DUCATELLE, R.; CROUBELS, S. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene
37 expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler
38 chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small
39 intestine. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-7, 2013.
- 40 PELYHE, C.; KÖVESI, B.; ZÁNDOKI, E.; KOVÁCS, B.; ERDÉLYI, M.; KULCSÁR, S.;
41 MÉZES, M.; BALOGH, K. Multi-trichothecene mycotoxin exposure activates glutathione-
42 redox system in broiler chicken. **Toxicon**, v. 153, p. 53-57, 2018.
- 43 REN, Z.; WANG, Y.; DENG, H.; DENG, Y.; DENG, J.; ZUO, Z.; WANG, Y.; PENG, X.; CUI,
44 H.; SHEN, L. Deoxynivalenol induces apoptosis in chicken splenic lymphocytes via the reactive
45 oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Environmental Toxicology and**
46 **Pharmacology**, v. 39, n. 1, p. 339-346, 2015.

- 1 RICHARD, J. L. **Characterization of the most common mycotoxins**, em: Romer Labs'
2 Guide to Mycotoxins. Mycotoxins—An Overview; 4^a ed.; Anytime Publishing Services:
3 Leicestershire, UK, v.01, p. 20–23, 2000.
- 4 RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of
5 mycotoxins in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, p. 663-675, 2012.
- 6 RUSSELL, R.; PATERSON, M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in
7 food? **Food Research International**, v.43, p.1902–1914, 2010.
- 8 SANTOS, J. S.; OLIVEIRA, T. M.; MARTINS, L. M.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.;
9 PIRES, J. L. F.; MIRANDA, M. Z.; GARCIA, S.; ITANO, E. N.; ONO, E. Y.; KAMURA, O.;
10 HIROOKA, E. Y. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. **Semina:
11 Ciências Agrárias**, v. 32, p. 1439-1450, 2011.
- 12 SANTOS, J. S.; SOUZA, T. M.; ONO, E. Y.; HASHIMOTO, E. H.; BASSOI, M. C.;
13 MIRANDA, M. Z.; ITANO, E. N.; KAMURA, O.; HIROOKA, E. Y. Natural occurrence of
14 deoxynivalenol in wheat from Paraná State, Brazil and estimated daily intake by wheat
15 products. **Food Chemistry**, v.138, p.90-95, 2013.
- 16 SCHWARTZ-ZIMMERMANN, H. E.; FRUHMANN, P.; DÄNICKE, S.; WIESENBERGER,
17 G.; CAHA, S.; WEBER, J.; BERTHILLER, F. Metabolism of deoxynivalenol and deepoxy-
18 deoxynivalenol in broiler chickens, pullets, roosters and turkeys. **Toxins**, v. 7, p. 4706-4729,
19 2015.
- 20 STREIT, E.; SCHWAB, C.; SULYOK, M.; NAEHRER, K.; KRŠKA, R.; SCHATZMAYR, G.
21 Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in
22 feed and feed ingredients. **Toxins**, v.05, p.504-523, 2013.
- 23 STROKA, J.; GONÇALVES, C. Mycotoxins in food and feed: an overview. In: MELTON, L;
24 SHAHIDI, F, et al. (Ed.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Oxford: Academic Press, v.1,
25 2019. p.401-419. ISBN 978-0-12-814045-1.
- 26 TAHEUR, F. B.; KOUIDHI, B.; AL QURASHI, Y. M. A.; BEN SALAH-ABBÈS, J.;
27 CHAIEB, K. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and
28 enzymes. **Toxicon**, v. 160, p. 12-22, 2019.
- 29 TRALAMAZZA, S. M.; BEMVENUTI, R. H.; ZORZETE, P.; GARCIA, F. S.; CORRÊA, B.
30 Fungal diversity and natural occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in freshly harvested
31 wheat grains from Brazil. **Food Chemistry**, v. 196, p. 445–450, 2016.
- 32 VILA-DONAT, P.; MARÍN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. A review of the mycotoxin
33 adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed
34 decontamination. **Food and Chemical Toxicology**, v. 114, p. 246–259, 2018.
- 35 WANG, A.; HOGAN, N. S. Performance effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on broiler
36 chickens: influences of timing and duration of exposure. **Animal Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 32-40,
37 2019.
- 38 WU, S.; LIU, Y.; DUAN, Y.; WANG, F.; GUO, F.; YAN, F.; YANG, X.; YANG, X. Intestinal
39 toxicity of deoxynivalenol is limited by supplementation with *Lactobacillus plantarum* JM113
40 and consequentially altered gut microbiota in broiler chickens. **Journal of Animal Science and
41 Biotechnology**, v. 9, p. 74, 2018.
- 42 YANG, X.; LI, L.; DUAN, Y.; YANG, X. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum*
43 JM113 in vitro and its protective effect on broiler chickens challenged with deoxynivalenol.
44 **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 2, p. 837-846, 2017.
- 45 YU, H.; ZHOU, T.; GONG, J.; YOUNG, C.; SU, X.; LI, X.-Z.; ZHU, H.; TSAO, R.; YANG, R.
46 Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the
47 approach of PCR-DGGE guided microbial selection. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 182-
48 191, 2010.

- 1 YUNUS, A. W.; BLAJET-KOSICKA, A.; KOSICKI, R.; KHAN, M. Z.; REHMAN, H.;
2 BOHM, J. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: intestinal development, absorptive
3 functionality, and metabolism of the mycotoxin. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 852-861,
4 2012a.
- 5 YUNUS, A. W.; GHAREEB, K.; TWARUZEK, M.; GRAJEWSKI, J.; BÖHM, J.
6 Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: Effects on bird performance and response to
7 common vaccines. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 844-851, 2012b.
- 8 ZUIDHOF, M. J.; SCHNEIDER, B. L.; CARNEY, V. L.; KORVER, D. R.; ROBINSON, F. E.
9 Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. **Poultry**
10 **Science**, v. 93, n. 12, p. 2970-2982, 2014.
- 11
- 12

1 **4. HIPÓTESE**

2

3 A ingestão de dieta contaminada com DON (19,3 mg kg⁻¹) induz efeitos tóxicos
4 sobre a saúde de frangos de corte e a utilização de um pool de *Lactobacillus* spp. em
5 três diferentes formas de apresentação (viável, inativado e sobrenadante da cultura) é
6 capaz de interagir com a micotoxina no intestino e reduzir seus efeitos tóxicos.

7

1 **5. OBJETIVOS**

2

3 5.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Avaliar os efeitos tóxicos do fornecimento de uma dieta contaminada por DON
6 (19,3 mg kg⁻¹) e os efeitos do tratamento com um pool de *Lactobacillus* spp. viável,
7 inativado e sobrenadante da cultura, sobre a saúde de frangos de corte.

8

9 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

10

11 Avaliar em frangos de corte aos 14 dias de vida, os efeitos do fornecimento de
12 uma dieta contaminada com DON e do tratamento com um pool de *Lactobacillus* spp.
13 viáveis, inativados e sobrenadante da cultura, sobre:

14

- morfologia e morfometria intestinal;

15

- contagem de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais intestinais;

16

- morfologia hepática;

17

- estresse oxidativo e resposta antioxidante intestinal, hepática e renal.

18

19

20

6. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente artigo será submetido à revista Food and Chemical Toxicology.

***Lactobacillus* spp. reduces morphological changes and oxidative stress induced by deoxynivalenol on broilers' intestines and liver**

ABSTRACT

Deoxynivalenol (DON) is the most prevalent mycotoxin worldwide. This study aimed to investigate the effects of the treatments with *Lactobacillus* spp. on the intestine, liver and kidney of poultry fed a DON-contaminated diet. One-day-old broilers chickens (n 50) were divided into five treatments: control, DON (19.3 mg kg⁻¹), viable *Lactobacillus* spp.+DON (VL+DON), heat-inactivated *Lactobacillus* spp.+DON (HIL+DON), *Lactobacillus* spp. culture supernatant+DON (LCS+DON). DON increased the intestinal and liver lesional score, while the *Lactobacillus* spp. treatments (LT) remained similar to the control. DON reduced the villi height and increased the crypt depths. The LT showed crypt depths similar to control, and higher villi:crypt ratio in duodenum and jejunum. In the ileum, the LT reduced the goblet cell count in relation to DON group. DON increased the number of intraepithelial lymphocytes in jejunum and ileum, and VL+DON had the lowest count. DON-diet increased TBARS in jejunum; and reduced the GSH levels in jejunum and ileum. In the liver DON increased the NBT and decreased the FRAP levels, the LT kept similar to control. DON induced no change in redox balance in the kidney. The LT improved the intestinal health after DON exposure and reduced the oxidative stress damage mainly on jejunum and liver.

KEYWORDS: Gut health. Probiotic. Mycotoxins. Detoxification. Poultry.

1 **1. Introduction**

2 Filamentous fungi produce mycotoxins, which are ubiquitous and heat-stable
3 low molecular weight (100-700 g/mol) toxic metabolites (STROKA; GONÇALVES,
4 2019; TAHEUR et al., 2019). Cereals are the main food source for humans and animals,
5 and the contamination by toxigenic fungi can occur in different steps of the food chain,
6 involving pre and post-harvest factors (TAHEUR et al., 2019). Climate changes
7 involving global warming provide favorable conditions for fungal growth, making
8 mycotoxin contamination an increasing problem (PATERSON; LIMA, 2010). It is
9 estimated that around 60-80% of the world's food crops are contaminated with
10 mycotoxins (ESKOLA et al., 2019). Annually aflatoxins, fumonisins and
11 deoxynivalenol cause \$418 million to \$1.66 billion of losses in cereal production, and in
12 livestock the estimated cost range from \$466 million due to the need to mitigating the
13 toxic effects to \$6 million related with economic losses (MAGNOLI; POLONI;
14 CAVAGLIERI, 2019).

15 Deoxynivalenol (DON) is the most prevalent mycotoxin worldwide (STREIT et
16 al., 2013; BIOMIN, 2017; LEE; RYU, 2017). In *in vitro* studies DON induced a strong
17 toxicity in human embryonic stem cells (hESC-H9) (FANG et al., 2018), and also
18 reduced cellular protein synthesis, proliferation and survival rate in human colonic
19 (Caco-2), lung (A549) and monocytic (U937) cell lines (INSTANES; HETLAND,
20 2004). DON toxicity is related to protein synthesis inhibition through the 60S ribosomal
21 subunit binding, affecting cells with a high renewal rate, such as the gastrointestinal
22 tract (GIT) and immune system; changes in these systems result in higher susceptibility
23 to diseases (BONDY; PESTKA, 2000; PESTKA, 2007).

24 In the European Union, the regulatory guidelines for DON level in finished
25 poultry feed are 5 mg kg⁻¹ (E.C., 2006). In Brazil there is no legislation for mycotoxins

1 contamination levels in animals feed, and frequently feedstock with higher levels of
2 DON is used in poultry feed, since this is considered one of the most tolerant species to
3 this mycotoxin (MARESCA, 2013). However, negative effects are reported in broilers
4 fed DON-contaminated diets, as performance failures (LIU et al., 2019), increased
5 mortality (ANDRETTA et al., 2011) and modulation of the immune response
6 (AGUZEY et al., 2019). Increased intestinal permeability and microorganism
7 translocation were also reported in poultry receiving a DON contaminated diet (AWAD
8 et al., 2019), as well as reduced villi height mainly in later growth phases (WANG;
9 HOGAN, 2019). Due to the significant impact of mycotoxins on poultry health,
10 strategies to reduce economic losses are necessary.

11 Previous studies have shown that some microorganisms including *Lactobacillus*
12 spp. can bind or detoxify DON reducing its negative effects (AWAD, et al., 2006a;
13 FRANCO et al., 2011; YANG et al., 2017). El-Nezami et al. (2002) found that viable
14 and heat-inactivated *L. rhamnosus* and *Propionibacterium* strains were equally effective
15 to bind DON *in vitro*. In addition, jejunal explants from piglets previously treated with
16 *L. plantarum* culture supernatant and exposed to DON showed a significant reduction in
17 intestinal toxicity (MAIDANA et al., 2017).

18 Bacterial detoxification showed beneficial results concerning DON toxicity,
19 resulting in non-toxic metabolites such as de-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1)
20 (PIERRON et al., 2016). Therefore, this approach is of increasing interest in mitigation
21 and control strategies. Considering these aspects, the present study aimed to investigate
22 the effects of different presentation forms of a mixture of *Lactobacillus* spp. on the
23 intestinal health, liver and kidney of poultry fed a DON-contaminated diet using
24 histomorphometrical assays. The oxidative stress and the anti-oxidative capacity
25 response were also evaluated.

1 **2. Material and Methods**

2 *2.1 Animals*

3 One-day-old broilers chickens (n 50) male, Ross lineage, were housed in
4 experimental cages. Animals received water and food *ad libitum*, heating and lighting
5 according to the lineage guideline. The animals were randomly divided into five
6 treatments, with 10 animals each: control, DON 19.3 mg kg⁻¹, viable *Lactobacillus*
7 spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹ (VL+DON), heat-inactivated *Lactobacillus* spp.+DON 19.3 mg
8 kg⁻¹ (HIL+DON) and *Lactobacillus* spp. culture supernatant+DON 19.3 mg kg⁻¹
9 (LCS+DON). This work was performed in accordance with the Institutional Ethics
10 Committee for Animal Experimentation (CEUA/UEL number 12433.2018.03).

11 *2.2 Experimental diets*

12 All animals received an uncontaminated diet from 1 to 6 days of age (DA),
13 composed mainly of corn (48.16%) and soybean meal (43.70%); after this period, they
14 received a diet composed of corn (15%), soybean meal (35.31%) and wheat (40.13%)
15 (Table 1) contaminated with 19.3 mg kg⁻¹ of DON, until 14 DA. The control treatment
16 received the uncontaminated diet throughout the experiment.

17

18

19

20

21

22

23

24

25

1 **Table 1** - Composition of the experimental diets (%)

Ingredient	Pre-initial	Starter
	0-6 DA	7-14 DA
Wheat	-	40.43
Corn	48.16	15.00
Soybean meal	43.70	35.31
Soybean oil	3.79	5.40
Dicalcium phosphate	1.82	0.93
Calcareous	1.04	1.32
NaCl	0.52	0.50
DL-methionine	0.33	0.30
L-lysine HCL	0.10	0.21
L-threonine	0.04	0.10
Premix*	0.50	0.50
Total	100	100
Nutritional levels	0-6 DA	7-14 DA
Energy kcal/kg	2.975	3.050
Protein (%)	24.27	23.31
Linoleic acid (%)	3.355	-
Calcium (%)	0.971	0.878
Phosphorus available (%)	0.463	0.310
Lysine dig (%)	1.307	1.256
Methionine dig (%)	0.646	0.600
Methionine+cistine dig (%)	0.967	0.929
Threonine dig (%)	0.863	0.829
Tryptophan dig (%)	0.277	0.271
Sodium (%)	0.225	0.218

2 DA- days of age. Premix* - Iron 8,400 mg kg⁻¹; Copper 3,200 mg kg⁻¹; Manganese 13.60 g kg⁻¹; Zinc
3 10.80 g kg⁻¹; Iodine 146 mg kg⁻¹; Selenium 52 mg kg⁻¹; Vitamin A 2,500,000 UI/kg; Vitamin D3 420,000
4 UI/kg; Vitamin E 6,000 UI/kg; Vitamin K3 500 mg kg⁻¹; Vitamin B1 500 mg kg⁻¹; Vitamin B2 1,600 mg
5 kg⁻¹; Niacin 7,000 mg kg⁻¹; Vitamin B6 900 mg kg⁻¹; Folic acid 200 mg kg⁻¹; Biotin 36 mg kg⁻¹; Vitamin
6 B12 16,000 µg kg⁻¹; Colin 80 g kg⁻¹; Methionine 178.20 g kg⁻¹.

7

8

2.3 Experimental design

9 The animals received by oral gavage 1 mL of a *Lactobacillus* spp. pool at the
10 ages described in Figure 1. The control and DON group received 1 mL of sterile MRS

1 (De Man, Rogosa and Sharpe media, HiMedia) broth. The *Lactobacillus* spp. pool was
2 composed of the same amount of three strains: one strain of *L. reuteri* and two strains of
3 *L. plantarum*. The samples were isolated from broilers chickens (*L. reuteri* and *L.*
4 *plantarum*) and from wheat (*L. plantarum*) in previous studies (FRANCO et al., 2011;
5 ROCHA et al., 2014). The mean cell density of the *Lactobacillus* spp. pool was 8.20 log
6 CFU/mL.

7 The samples were grown in *Lactobacillus* MRS broth and incubated at 37 °C/24
8 h, under microaerophilia conditions. The probiotic strains were supplied from three
9 different forms: *i.* a fresh culture of viable *Lactobacillus* spp. pool; *ii.* a heat-inactivated
10 culture of *Lactobacillus* spp. pool and *iii.* a supernatant culture from a pool of heat-
11 inactivated *Lactobacillus* spp.

12 The inactivation of the *Lactobacillus* spp. was performed through heat (121 °C
13 for 30 min), followed by centrifugation at 3000g, 10 min, 5°C. The cell supernatant was
14 removed, and the cell pellet resuspended in the same volume of MRS sterile broth
15 (FRANCO et al., 2011). The supernatant was filtrated using a 3µm syringe filter.

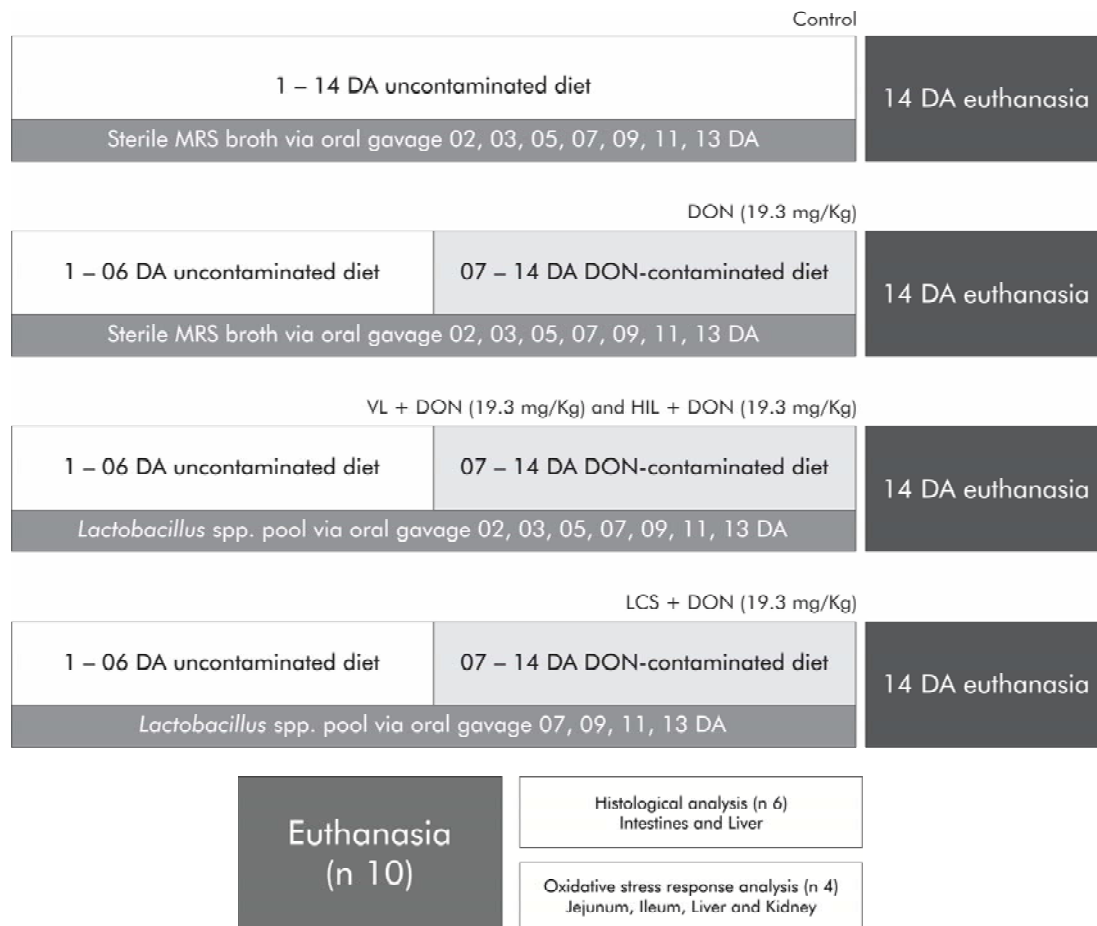
16 The viable and heat-inactivated pools were supplied since the second DA, after
17 on alternate days until euthanasia; the culture cell supernatant was supplied only since
18 the seventh DA because it was the day that the animals started to eat the contaminated
19 diet. We believe that the culture cell supernatant was not able to modulate the intestinal
20 microbiota, avoiding an adaptation period as the viable and heat-inactivated pools, that
21 besides acting against DON could act as probiotic and prebiotic respectively.

22 The animals were euthanized by cervical dislocation at 14 DA and samples from
23 the intestines (duodenum, jejunum, ileum, and cecum) and liver were fixed in a 10%
24 buffered formalin solution for histopathological evaluation. For the oxidative stress

1 response analysis samples from the jejunum, ileum, liver, and kidney were collected in
 2 sterile microtubes and stored at -80°C (Figure 1).

3

4 **Figure 1** – Experimental design and sample collection illustration



5

6

7 Control – uncontaminated diet, DON – diet with DON 19.3 mg kg⁻¹, VL+DON – Viable *Lactobacillus*
 8 spp. + DON 19.3 mg kg⁻¹, HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus* spp. + DON 19.3 mg kg⁻¹,
 9 LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant + 19.3 mg kg⁻¹. DA – days of age; n - number of
 10 animals per treatment.

11

12 2.4 Histological analysis

13 The samples (n 6/group) were dehydrated in increasing alcohol concentration
 14 solutions, diaphanized in xylol and embedded in paraffin for histological analysis.

15 Tissues sections of 5 µm were stained with hematoxylin and eosin (HE) and a lesion

16 score was applied according to Bracarense et al. (2012) and Grenier et al. (2011) with

1 some modifications (Table 2). The villi height and crypt depth from duodenum (2.5X
 2 magnification for villi height and 10X for crypt depth), jejunum and ileum (10X
 3 magnification) were measured in 30 villi and crypt randomly chosen per slide using a
 4 software image program analysis (Motic Image Plus 2.0 software, Motic Instruments,
 5 Richmond, Canada).

6 The density of goblet cells was evaluated in tissue sections stained with Alcian
 7 Blue (AB). The goblet cells were counted in 15 ileum villi and in five random fields at
 8 the cecum (20X magnification). The number of intraepithelial lymphocytes was counted
 9 in 12 villi randomly chosen using a 40 X objective at the optical microscope in HE
 10 stained tissues.

11

12 **Table 2 -** Histological criteria used to establish the intestinal and liver lesional score

Intestine				Liver		
Lesion		Severity factor	Maximal score	Lesion	Severity factor	Maximal score
Lymphatic vessel dilation		01	45	Disorganization of hepatic cords	01	36
Villi flattening		01		Inflammatory infiltrate (modified)	01	
Villi fusion		01		Congestion (modified)	01	
Interstitial edema		01		Cell vacuolation	01	
Inflammatory infiltrate (modified)		01		Nuclear vacuolation	01	
Congestion (modified)		01		Megalocytosis	02	
Cell vacuolation		01		Apoptosis	02	
Bacteria adhered to the villi (modified)		01		Necrosis (modified)	03	
Flattening Enterocytes		02				
Cell debris (modified)		02				
Superficial epithelial cell necrosis		03				

13 * The lesion score was obtained by multiplying the severity factor with the extent of the lesion. The
 14 extent of each lesion (intensity or frequency) was evaluated and scored as: 0, no lesion; 1, low extent (25
 15 % of the intestinal section affected); 2, intermediate extent (50 % of the intestinal section affected); 3,

1 large extent (75 % of the intestinal section affected). Adapted from: Bracarense et al. (2012); Grenier et
2 al. (2011).

3

4 *2.5 Oxidative stress response analysis*

5 Samples (n 4/group) of intestines (jejunum and ileum), liver and kidney were
6 collected in sterile microtubes, maintained at -80°C. For measuring the antioxidant
7 capacity the tests of reduced glutathione (GSH) according to Sedlak and Lindsay
8 (1968), ferric reducing ability (FRAP) and reducing of 2,2'-azino-bis (3-
9 ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) following the methodologies described
10 by Katalinic et al. (2005) were performed.

11 The oxidative stress response was evaluated by the tests nitro blue tetrazolium
12 (NBT) and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), following Watanuki et al.
13 (2006) and Guedes et al. (2006) methodologies, respectively. Briefly, using a tissue
14 tearor (Bjospec, São Paulo, SP, Brazil) the samples were homogenized in KCL (1.15%)
15 buffer for FRAP, ABTS, NBT and TBARS, and EDTA buffer (0.02 M) for GSH test,
16 followed by the protocol described by the authors cited above.

17

18 *2.6 Statistical analysis*

19 The experimental design was entirely randomized. The data were analyzed with
20 the free software R[®] version 3.4.4 submitted to ANOVA with a significance level of
21 5%. If the means were statistically significant the data were submitted to Duncan
22 multiple comparison test with a 5% significance level. For the lesion score the data that
23 did not reach the assumption of normality of errors were submitted to logarithmic
24 transformation followed by ANOVA and Duncan test.

25

26

1 **3. Results**

2 3.1 *Lactobacillus spp. improves intestinal and liver morphology and decreases* 3 *intestinal inflammation*

4 Broilers fed the DON-contaminated diet showed a significant increase in
5 intestinal lesions compared to control treatment (Figure 2A, 2B). The jejunum was
6 more affected than ileum, mainly in a mild to moderate intensity. The main findings in
7 this group were adherence of bacteria on the villi, vascular changes, inflammatory
8 infiltrate, interstitial edema, enterocyte cytoplasmic vacuolation, and villus atrophy
9 (Figure 2C-D). Conversely, the intestine of broilers receiving *Lactobacillus spp.*
10 remained similar to the control group showing normal villi lined by columnar
11 enterocytes (Figure 2B and E).

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

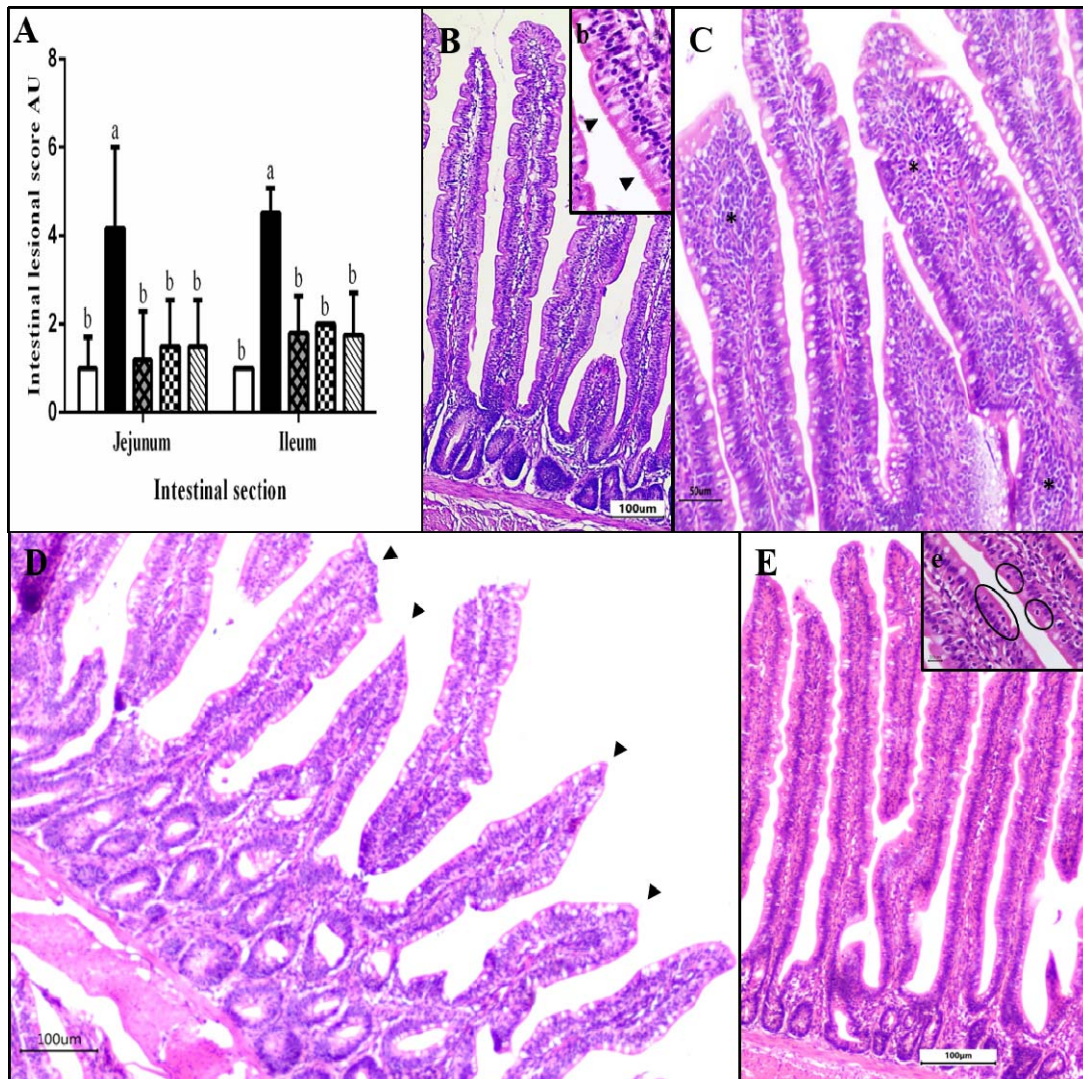
22

23

24

25

1 **Figure 2** – Intestinal lesion score and morphology of broilers submitted to different
 2 treatments

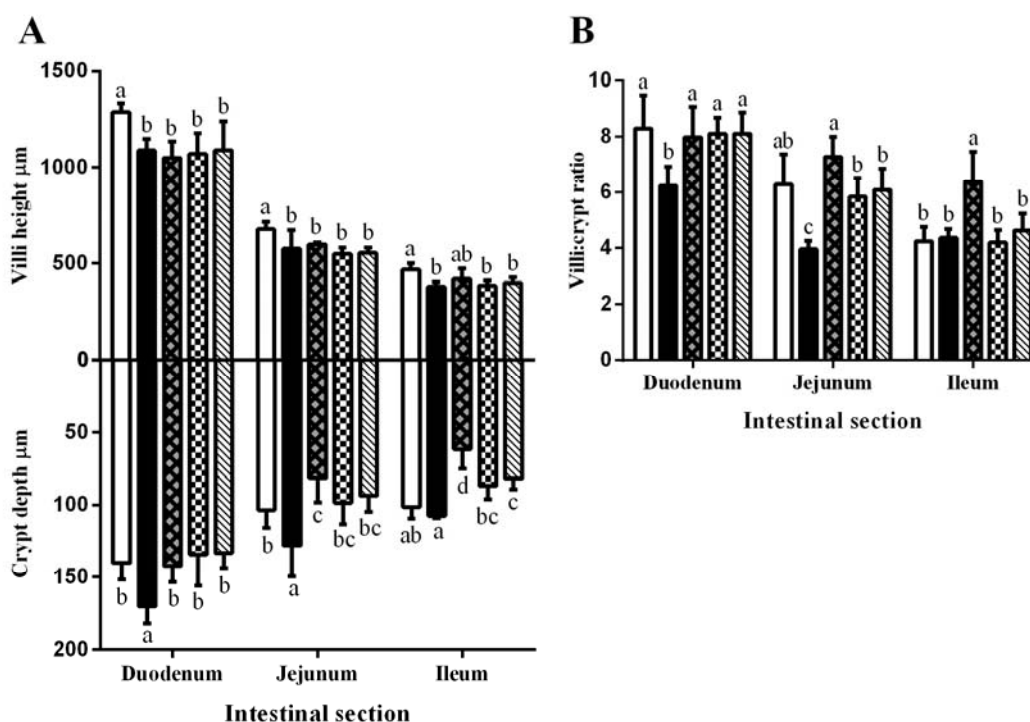


3 A- Control – uncontaminated diet (□); DON - diet with DON 19.3 mg kg⁻¹ (■); VL+DON – Viable
 4 *Lactobacillus* spp. + DON 19.3 mg kg⁻¹ (▣); HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus* spp. + DON
 5 19.3 mg kg⁻¹ (▤); LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant + DON 19.3 mg kg⁻¹ (▥). a, b
 6 Different letters are significantly different ($P \leq 0.05$). Duncan test. Means (AU - arbitrary unit) ± standard
 7 deviation. B- Jejunum control group: normal intestine. HE. Bar 100µm; Insert- normal columnar
 8 enterocytes. HE. Bar 50 µm; C- Jejunum DON group inflammatory infiltrate (*). HE. Bar 500 µm; D-
 9 Jejunum DON group villi atrophy (▲). HE. Bar 100 µm; E- Jejunum LCS+DON: normal villi
 10 morphology. HE. Bar 100 µm; Insert- Jejunum LCS+DON: intraepithelial lymphocyte (circles). HE. Bar
 11 50 µm.
 12

13 The morphometrical analysis of villi height was significantly decreased in
 14 broilers fed DON and *Lactobacillus* diets compared to the control group in the
 15 duodenum and jejunum, while in the ileum the viable *Lactobacillus* treatment remained
 16 similar to the control. DON induced a significant increase in crypt depth to the
 17 duodenum and jejunum compared to all the other treatments (Figure 3A). In the ileum,

1 the ingestion of viable *Lactobacillus* spp. resulted in a significant decrease in crypt
 2 depth when compared to other groups (Figure 3A). All the *Lactobacillus* spp. treatments
 3 improved the villi:crypt ratio in the duodenum and jejunum when compared to the DON
 4 group (Figure 3B). In the ileum the viable *Lactobacillus* spp. treatment showed the
 5 highest villi:crypt ratio (Figure 3B).

6 **Figure 3**– Intestinal morphometry (villi height, crypt depth and villi:crypt ratio) of
 7 broilers submitted to different treatments



8

9 A- Control – uncontaminated diet (□); DON - diet with DON 19.3 mg kg⁻¹ (■); VL+DON – Viable
 10 *Lactobacillus* spp. + DON 19.3 mg kg⁻¹ (▣); HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus* spp. + DON
 11 19.3 mg kg⁻¹ (▤); LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant + DON 19.3 mg kg⁻¹ (▥). a, b, c, d
 12 Different letters are significantly different (P ≤ 0.05). Duncan test. Means (μm) ± standard deviation. A-
 13 Duodenum, jejunum, ileum; villi height and crypt depth. B- Duodenum, jejunum, ileum; villi:crypt ratio.

14 Mucus production is related to goblet cell density and is an important component
 15 of the intestinal barrier (JEURISSEN et al., 2002). The ingestion of the DON-diet
 16 enhanced significantly the number of goblet cells in the ileum compared to other
 17 treatments. The number of goblet cells in viable *Lactobacillus* spp. treatment remained

1 like the control group. In the cecum no significant difference was observed among the
2 treatments (Table 3).

3 **Table 3** – Mean number and standard deviation of goblet cells in the ileum and cecum
4 of broilers submitted to different treatments

Treatments	Goblet cells	
	Ileum	Cecum
Control	32.05 ± 2.04 ^d	51.88 ± 2.37 ^a
DON	48.13 ± 4.03 ^a	55.04 ± 2.84 ^a
VL + DON	33.30 ± 2.79 ^{cd}	55.92 ± 5.40 ^a
HIL + DON	37.36 ± 3.13 ^b	52.90 ± 4.56 ^a
LCS + DON	36.90 ± 1.76 ^{bc}	59.52 ± 7.67 ^a

5 Control – uncontaminated diet; DON – diet with DON 19.3 mg kg⁻¹; VL+DON – Viable *Lactobacillus*
6 spp. + DON 19.3 mg kg⁻¹; HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus* spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹;
7 LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant + DON 19.3 mg kg⁻¹. ^{a, b, c, d} Different letters in the
8 same column mean a significant difference (P ≤0.05). Duncan test.

9 Intestinal intraepithelial lymphocytes are sentinels of the mucosal barrier and
10 can be used to evaluate tissue inflammation (KAER; OLIVARES-VILLAGOMEZ,
11 2018). DON exposure increased the number of intraepithelial lymphocytes in both
12 jejunum and ileum when compared to the control group. In the ileum, the ingestion of
13 viable *Lactobacillus* spp. induced a significant decrease in intraepithelial lymphocytes
14 compared to other treatments (Table 4).

15 **Table 4** – Mean number and standard deviation of intraepithelial lymphocytes in the
16 jejunum and ileum of broilers submitted to different treatments

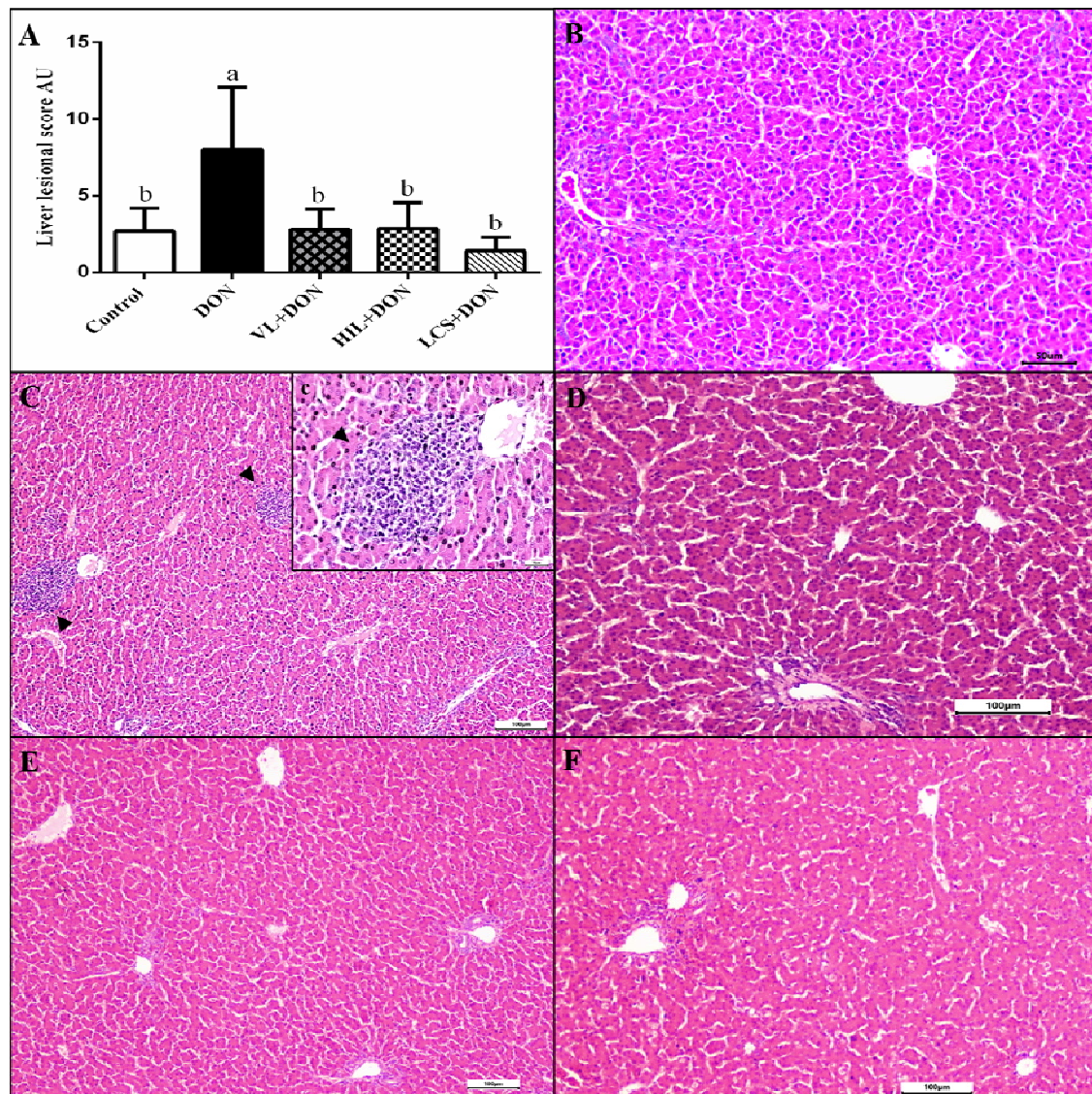
Treatments	Intraepithelial lymphocytes	
	Jejunum	Ileum
Control	21.63 ± 1.05 ^c	17.25 ± 1.59 ^b
DON	38.00 ± 0.77 ^a	20.66 ± 1.74 ^a
VL + DON	23.16 ± 3.46 ^c	14.56 ± 0.87 ^c
HIL + DON	29.35 ± 2.66 ^b	19.20 ± 2.45 ^{ab}
LCS + DON	32.73 ± 3.30 ^b	18.85 ± 1.56 ^{ab}

17 Control – uncontaminated diet; DON – diet with DON 19.3 mg kg⁻¹; VL+DON – Viable *Lactobacillus*
18 spp. + DON 19.3 mg kg⁻¹; HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus* spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹;
19 LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant + DON 19.3 mg kg⁻¹. ^{a, b, c} Different letters in the
20 same column mean a significant difference (P ≤0.05). Duncan test.

1 Similarly to the intestine, ingestion of DON induced a significant increase in the
 2 liver lesion score. The most frequent lesions observed were inflammatory infiltrate,
 3 congestion, cytoplasmic hepatocellular vacuolation, megalocytosis, trabecular
 4 disorganization, and necrosis. On the other hand, *Lactobacillus* spp. treatments
 5 presented a normal histological aspect, and the lesion score was analogous to the control
 6 group (Figure 4).

7

8 **Figure 4** – Liver lesion score and morphology of broilers submitted to different
 9 treatments



10

11

12

13

A- Control – uncontaminated diet (□), DON - diet with DON 19.3 mg kg⁻¹ (■), VL+DON – Viable *Lactobacillus* spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹ (▣), HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus* spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹ (▤); LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant+DON 19.3 mg kg⁻¹ (▥). a, b Different

1 letters are significantly different ($P \leq 0.05$). Duncan test. Means (AU - arbitrary unit) \pm standard
2 deviation. B- Liver control group: normal morphology. HE. Bar 50 μ m; C- Liver DON group: moderate
3 presence of inflammatory infiltrate (\blacktriangle). HE. Bar 100 μ m; Insert- Liver DON group: inflammatory
4 infiltrate (\blacktriangle) higher magnification. HE. Bar 20 μ m; D- Liver VL+DON: normal morphology. HE. Bar
5 100 μ m; E- Liver HIL+DON: normal morphology. HE. Bar 100 μ m; F- Liver LCS+DON: normal
6 morphology. HE. Bar 100 μ m.

7 3.2 Oxidative stress response assay

8 The production of reactive oxygen species (ROS) was evaluated through
9 TBARS and NBT assays. Broilers from DON and LCS+DON treatments showed an
10 increased level of TBARS in the jejunal region compared to the VL+DON and
11 HIL+DON treatments that remained like control (Table 5). In the ileum, the control
12 group showed the lowest TBARS level and the HIL+DON the highest, no differences
13 were observed among the other treatments (Table 5). Concerning the NBT assay, all
14 treatments presented no difference with the control in both regions of the intestine
15 (Table 5).

16 The capacity to respond to oxidative stress was assessed using three different
17 assays: GSH, FRAP and ABTS. The levels of GSH, when compared to the control,
18 were significantly reduced in animals fed DON and LCS+DON diets in the jejunum,
19 whereas in the ileum all treatments resulted in decreased levels (Table 5). Ingestion of
20 DON-containing diets reduced the ABTS levels in the jejunum compared to the control;
21 however, in the ileum the decrease was observed only in the *Lactobacillus* spp.
22 treatments compared to control and DON treatments. In jejunum no significant
23 difference was observed in FRAP levels among all the treatments, while in the ileum of
24 broilers receiving *Lactobacillus* spp. a decrease in the levels was observed compared to
25 control (Table 5).

26 In the liver, DON induced a significant increase in NBT levels in comparison to
27 other groups, while no difference was observed in TBARS levels among the treatments
28 compared to the control group (Table 6). The highest GSH levels were observed on the

1 treatments VL+DON and LCS+DON compared to the DON group; for ABTS the
2 highest level was observed on the LCS+DON and the lowest on the control group, but
3 no difference were observed among the other treatments. A decrease in FRAP levels
4 was verified in DON group compared to control, the *Lactobacillus* spp. treatments kept
5 the levels similar to control (P=0.0079) (Table 6).

6 In the kidney there was no difference in TBARS levels among the groups
7 control, DON and LCS+DON; however, the highest level was from the VL+DON and
8 the lowest from the HIL+DON treatments (Table 6). Regarding to NBT the lowest level
9 was from the control group and the highest from the VL+DON, there was no difference
10 among the other treatments (Table 6).

11 In general, the capacity to respond to oxidative stress in the kidney remained
12 similar among the treatments. A decrease in GSH, ABTS and FRAP levels was
13 observed in VL+DON treatment in comparison to control group (Table 6).

1 **Table 5** – Effects of deoxynivalenol (DON) on oxidative stress on jejunum and ileum of broiler chickens

2

Treatments	TBARS		NBT		GSH		ABTS		FRAP	
	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum	Jejunum	Ileum
Control	0.017 ^b ± 0.007	0.026 ^b ± 0.006	0.035 ^{ab} ± 0.005	0.059 ^{ab} ± 0.018	2,411 ^a ± 350.6	2,053 ^a ± 229.1	188.1 ^a ± 34.86	130.4 ^a ± 10.64	59.60 ^a ± 21.10	69.70 ^a ± 13.06
DON	0.044 ^a ± 0.011	0.026 ^{ab} ± 0.012	0.062 ^{ab} ± 0.030	0.043 ^b ± 0.008	1,342 ^{bc} ± 330.9	1,147 ^b ± 110.4	129.8 ^b ± 15.84	112.0 ^a ± 11.48	65.09 ^a ± 14.67	65.89 ^{ab} ± 15.61
VL + DON	0.022 ^b ± 0.005	0.032 ^{ab} ± 0.010	0.029 ^b ± 0.020	0.056 ^{ab} ± 0.010	2,156 ^a ± 528.5	926.7 ^{bc} ± 392.3	123.7 ^b ± 10.18	70.36 ^b ± 5.92	59.69 ^a ± 20.06	47.89 ^{bc} ± 9.34
HIL + DON	0.021 ^b ± 0.005	0.042 ^a ± 0.016	0.057 ^{ab} ± 0.008	0.075 ^a ± 0.024	1,809 ^{ab} ± 77.46	677.7 ^c ± 36.86	129.5 ^b ± 26.08	61.00 ^b ± 16.71	62.67 ^a ± 15.38	23.19 ^d ± 4.43
LCS + DON	0.044 ^a ± 0.020	0.037 ^{ab} ± 0.013	0.067 ^a ± 0.038	0.060 ^{ab} ± 0.015	839.3 ^c ± 273.0	1,098 ^b ± 118.5	123.9 ^b ± 43.10	69.90 ^b ± 11.75	57.55 ^a ± 18.95	29.96 ^{cd} ± 4.08

3 Control – uncontaminated diet, DON – diet with DON 19.3 mg kg⁻¹, VL+DON – Viable *Lactobacillus* spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹, HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus*
 4 spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹, LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant + DON 19.3 mg kg⁻¹. a, b, c, d Different letters in the same column mean a significant difference (P
 5 ≤0.05). Duncan test. Means ± standard deviation. Results are expressed as: TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) – OD/mg of tissue; NBT (nitroblue tetrazolium)
 6 OD/mg of tissue; GSH (reduced glutathione) - nmol/mg of protein; ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) – nmol Trolox Eq/mg of protein; FRAP
 7 (ferric-reducing antioxidant power) - nmol Trolox Eq/mg of protein.

8

9

10

11

12

1 **Table 6** – Effects of deoxynivalenol (DON) on oxidative stress on liver and kidney of broiler chickens

2

Treatments	TBARS		NBT		GSH		ABTS		FRAP	
	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney	Liver	Kidney
Control	0.004 ^{ab} ± 0.001	0.014 ^b ± 0.005	0.035 ^b ± 0.007	0.020 ^c ± 0.005	3,146 ^{ab} ± 1357	2,798 ^{ab} ± 666.5	124.2 ^b ± 13.40	167.1 ^a ± 6.339	238.4 ^a ± 26.26	182.6 ^a ± 40.36
DON	0.009 ^a ± 0.003	0.018 ^{ab} ± 0.004	0.052 ^a ± 0.008	0.032 ^{bc} ± 0.006	1,976 ^b ± 592.9	2,191 ^{bc} ± 745.8	136.8 ^{ab} ± 23.33	169.2 ^a ± 27.97	169.7 ^b ± 4.24	140.2 ^{ab} ± 21.97
VL + DON	0.004 ^b ± 0.002	0.026 ^a ± 0.007	0.023 ^b ± 0.010	0.053 ^a ± 0.007	4,213 ^a ± 860.4	1,333 ^c ± 532.1	144.0 ^{ab} ± 18.41	125.7 ^c ± 10.03	282.9 ^a ± 30.47	91.70 ^b ± 13.56
HIL + DON	0.007 ^{ab} ± 0.001	0.004 ^c ± 0.002	0.035 ^b ± 0.005	0.027 ^{bc} ± 0.010	3,762 ^{ab} ± 1061	2,060 ^{bc} ± 563.8	145.1 ^{ab} ± 1.83	182.1 ^a ± 5.216	272.5 ^a ± 32.47	139.8 ^{ab} ± 5.92
LCS + DON	0.008 ^{ab} ± 0.002	0.011 ^{bc} ± 0.003	0.033 ^b ± 0.011	0.041 ^{ab} ± 0.012	4,600 ^a ± 995.3	3,812 ^a ± 1115	150.6 ^a ± 2.32	163.3 ^{ab} ± 34.22	274.5 ^a ± 47.61	148.7 ^a ± 43.29

3 Control – uncontaminated diet, DON – diet with DON 19.3 mg kg⁻¹, VL+DON – Viable *Lactobacillus* spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹, HIL+DON – Heat-inactivated *Lactobacillus*
4 spp.+DON 19.3 mg kg⁻¹, LCS+DON - *Lactobacillus* spp. culture supernatant + DON 19.3 mg kg⁻¹. ^{a, b, c} Different letters in the same column mean a significant difference (P
5 ≤0.05). Duncan test. Means ± standard deviation. Results are expressed as: TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) – OD/mg of tissue; NBT (nitroblue tetrazolium)
6 OD/mg of tissue; GSH (reduced glutathione) - nmol/mg of protein; ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) – nmol Trolox Eq/mg of protein; FRAP
7 (ferric-reducing antioxidant power) - nmol Trolox Eq/mg of protein.

1 **4. Discussion**

2

3 4.1 *Effects of DON on intestines*

4 The intestine is the first system affected by the ingestion of mycotoxins, and
5 enterocytes are exposed to high levels of these compounds (BROOM, 2015). Broilers
6 are considered more resistant to the toxic effects of mycotoxins (MARESCA, 2013),
7 however intestinal changes induced by DON have been described on broilers intestines,
8 such as, alterations on villi morphology, reduction in the absorption area, reduced
9 expression of glucose and amino acid transporters, decreased TEER (trans-epithelial
10 electrical resistance), modulation of the cell junctions proteins and inflammatory factors
11 expression (GHAREEB et al., 2015; WU et al., 2018). In the present study, using a
12 broiler *in vivo* model, we have observed the toxic effects of DON in the intestines, liver
13 and kidney, and the beneficial effects of the ingestion of a pool of *Lactobacillus* spp. in
14 reducing the toxicity.

15 The intestinal toxicity of DON was characterized by an increase in the lesional
16 score (\approx 3-fold) and in the number of goblet cells (\approx 1.4-fold) and intraepithelial
17 lymphocytes (\approx 1.5-fold). Previous studies focused mainly on intestinal morphometry,
18 reporting mild villi atrophy (AWAD et al., 2006; GHAREEB et al., 2015). Similarly, in
19 the present study villi atrophy was observed accompanied by increased bacteria
20 adherence, vascular changes, inflammatory infiltrate, interstitial edema and enterocyte
21 cytoplasmic vacuolation. Alternatively, all treatments with *Lactobacillus* spp. remained
22 similar to the control in both regions of the intestine. In a previous study, broilers
23 receiving *Eubacterium* spp. as a strategy to deepoxidize DON showed a reduction in
24 intestinal histological alterations (AWAD et al., 2006a).

1 Villi height is correlated with the intestinal absorption area and intestinal crypts
2 are the site of new enterocytes multiplication (SWATSON et al., 2002). In this study,
3 the villi atrophy observed in the lesion score of broilers fed the DON diet was
4 confirmed by morphometrical analysis in all regions of the intestine, and this change
5 can result in a reduced intestinal absorption area. Different results were reported
6 concerning villi height in the literature. Awad et al. (2006b) reported a decrease in
7 duodenum villi height (5 mg kg⁻¹ of DON), while Wang and Hogan (2019) described no
8 changes (6.6 mg kg⁻¹ of DON). Since intestinal changes induced by DON were linearly
9 correlated with the feed contamination level (YUNUS et al., 2012), and that a higher
10 level of DON was used in the present study, a reduction in villi height was expected.

11 The *Lactobacillus* spp. treatments were not able to preserve the villi height,
12 except the viable *Lactobacillus* spp. treatment that kept the villi height like the control
13 group in the ileum. The beneficial effects of a probiotic microorganism in preserving the
14 small intestine morphometry have been previously reported (AWAD et al. 2006a).
15 Conversely to our findings, another study reported that the culture supernatants of
16 two *Lactobacillus plantarum* strains were the best to preserve the villi height an *ex vivo*
17 DON challenge (MAIDANA et al., 2017). This difference can be justified by the
18 different doses and models (poultry/*in vivo* and pig/*ex vivo*). In this *in vivo* study we
19 could not supply a protected culture supernatant (microencapsulated), and perhaps the
20 digestive process reduced the culture supernatant efficiency.

21 The crypt depth was also increased in the DON group in duodenum and
22 jejunum, this result indicates a high intestinal renewal rate, but all the *Lactobacillus* spp.
23 treatments kept shown crypt depths similar to the control group.

24 The villi:crypt ratio is an indicator of the intestinal renovation rate, so the higher
25 is villi:crypt ratios, the lowest is the intestinal turnover. In addition, a higher intestinal

1 turnover is related with a higher maintenance requirement leading to a lower
2 zootechnical performance (NEVEL et al., 2005). The beneficial effects of *Lactobacillus*
3 spp. treatment was evidenced in the villi:crypt ratio, mainly at the duodenum and
4 jejunum, where the ratio of these groups was similar to the control. The protective
5 effects of probiotic bacteria on gut morphometry have been previously reported (YANG
6 et al., 2017; YU et al., 2018). One strain of *L. plantarum* (viable or heat-inactivated
7 cells) used in this study showed in an *in vitro* model a reduction in the levels of DON
8 (FRANCO et al., 2011). In addition, the culture supernatant from this same strain was
9 effective in maintaining the morphology of jejunal piglets' explants exposed to DON
10 (MAIDANA et al., 2017). Recently, it was demonstrated that the surface of bacterial
11 cells of *L. paracasei* was able to bind DON forming complexes (ZHAI et al., 2019).
12 Other studies also suggest that *Lactobacillus* spp. may act detoxifying DON in non-
13 toxic compounds (CHLEBICZ; ŚLIŻEWSKA, 2019; QU et al., 2019).

14 Changes in the mucus barrier function induced by DON have been reported on
15 the duodenum of broilers through down-regulation of MUC2 expression and alteration
16 of the mucin monosaccharide composition, however, no effects were reported on
17 jejunum and ileum (ANTONISSEN et al., 2015). In addition, Wang and Hogan (2019)
18 reported an enhancement in goblet cell density in the ileum of broilers fed a DON diet
19 ($\approx 7 \text{ mg kg}^{-1}$), similarly to our results. Conversely, Xu et al. (2011) found no effect of
20 DON ($\approx 3\text{-}17 \text{ mg kg}^{-1}$) on this parameter in the ileum of broilers. In the ileum, all the
21 *Lactobacillus* spp. treatments were effective in maintaining the goblet cell density lower
22 than the DON group, moreover the viable *Lactobacillus* spp. treatment was the only that
23 remained analogous to the control group. An increased number of goblet cells are
24 associated with higher levels of mucus production, and mucus excess can be a rich
25 protein source to *C. perfringens* proliferation, contributing to establish ideal conditions

1 for the development of necrotic enteritis (MOORE, 2016). Interestingly, in the present
2 study no difference was observed in cecum, probably because the main action site of
3 DON is the small intestine (GHAREEB et al., 2015).

4 Intestinal intraepithelial lymphocytes (IEL) are considered components of the
5 intestinal barrier. Furthermore, these cells compound one of the largest immune
6 compartments, since one IEL is found for every 10 enterocytes; meanwhile, IEL can
7 also contribute to gastrointestinal inflammation and disease (KAER; OLIVARES-
8 VILLAGOMEZ, 2018). DON induced an increase in the number of IEL in the jejunum
9 and ileum compared to control, reinforcing the potential of DON to induce intestinal
10 inflammation. DON alters the intestinal paracellular permeability on chickens'
11 intestines, facilitating the translocation of enteric microorganisms and leading to local
12 inflammation (AWAD et al., 2019). Nevertheless, in the jejunum, the ingestion of
13 *Lactobacillus* treatments induced a decrease of IEL count, and in the ileum this positive
14 effect was observed only in the viable *Lactobacillus* spp. treatment compared to DON
15 group. To the best of authors' knowledge there is no previous data evaluating IEL
16 modulation by DON or acid lactic bacteria.

17 Oxidative stress (OE) occurs when there is an imbalance between reactive
18 species of oxygen (ROS) and the antioxidant defenses (HALLIWELL, 2007). Few
19 studies focused on the oxidative stress induced by DON in broilers' intestines. TBARS
20 is a ROS related to lipid peroxidation (GUEDES et al., 2006). In the present study,
21 DON exposure induced a 2.6-fold increase in jejunum TBARS levels, whereas the
22 treatments with viable *Lactobacillus* spp. and heat-inactivated *Lactobacillus* spp. were
23 able to keep their levels similar to the control group. The excess of free radicals, mainly
24 those associated with lipid peroxidation affect some organelles including the
25 mitochondria, leading to cell death (SILVA et al., 2018). Awad et al. (2014) also

1 reported higher TBARS levels on the jejunum after DON exposure, but their treatment
2 with a probiotic feed additive was not effective in reducing TBARS levels. In the ileum,
3 no difference in TBARS levels was observed between the control and DON groups,
4 reinforcing that jejunum is the region most affected by DON exposure (OSSELAERE et
5 al., 2013). No effects of DON were observed in the jejunum and ileum NBT levels,
6 suggesting that this pathway is not affected by this mycotoxin.

7 The antioxidant defense is composed by the superoxide dismutase (SOD),
8 catalase (CAT), and glutathione-related systems (GSH) (NORDBERG; ARNÉR, 2001).
9 In relation to the capacity to respond to oxidative stress, no significant difference was
10 observed in the DON group in the ileum and jejunum for FRAP levels compared to
11 control. DON induced a reduction of 30.9% in the ABTS levels in the jejunum. For
12 GSH a reduction of 44.3% was observed, while the treatments VL+DON and
13 HIL+DON remained similar to the control group. In the ileum a decrease of 44.13% in
14 the GSH levels was also observed, although the *Lactobacillus* spp. treatments were not
15 able to keep their levels similar to the control group. This can suggest that the
16 *Lactobacillus* spp. strains used in this study are more effective in reducing the oxidative
17 stress induced by DON in jejunum. Decreasing of antioxidants levels have already been
18 reported on chickens DON-challenge (MISHRA et al., 2014). The redox balance is vital
19 for the intestinal health status, and a reduction of the intestinal antioxidant enzymes can
20 be correlated with the intensity of the intestinal inflammation (CIRCU; AW, 2012).

21 4.2 *Effects of DON on liver and Kidney*

22 The liver and kidney play a key role in DON detoxification and excretion
23 (DÄNICKE; BREZINA, 2013). DON or its derivatives that reaches the systemic
24 circulation will be metabolized in the liver mainly to the sulfonation pathway, suffering
25 biliary or urinary excretion (GUERRE, 2015). In this study morphological liver changes

1 were induced on broilers fed a DON-contaminated diet; however all the *Lactobacillus*
2 spp. treatments had a protective effect. Inflammatory infiltrates, congestion, hepatocyte
3 cytoplasmic vacuolation, megalocytosis, trabecular disorganization and necrosis were
4 the main injuries found. Che et al. (2011) also reported broilers' liver morphology
5 alterations after exposition to mycotoxin contaminated diet, the main hepatocyte
6 cytoplasmic vacuolation.

7 Under physiological condition the ROS are responsible for cellular pathways
8 activation, defense against pathogenic microorganisms and influence the expression of
9 genes to promote cell growth or death, and in redox imbalance situation the liver is one
10 of the organs main affect by the oxidative stress (LI et al., 2015). The lipid peroxidation
11 (TBARS) enhance by DON was not statically significant from control on liver and
12 Kidney. Awad et al. (2012) and Awad et al. (2014) also reported the absence of
13 alterations on broilers' liver and kidney TBARS. Controversy to our findings, an
14 increase in malondialdehyde (MDA) was reported on chicken's liver, kidney and serum
15 after DON exposure (BORUTOVA et al., 2008; JIANG et al., 2014). DON increased
16 the NBT levels in 48.57% on liver, an up-regulation of an oxidative stress marker
17 (xanthine oxidoreductase) was also previously reported (OSSELAERE et al., 2013), in
18 this study all the *Lactobacillus* spp. treatments were effective to keep the levels similar
19 to control. DON did not alter the NBT levels on kidney.

20 Concerning the antioxidant ability on liver and kidney, DON did not influence
21 the GSH and ABTS levels. Borutova et al. (2008) reported a decrease in liver
22 glutathione peroxidase after DON exposure. In chicken embryo fibroblast DF-1 cells
23 DON increased ROS and MDA levels, a reduction on GSH and SOD was also reported
24 (LI et al., 2014). Liver FRAP levels were decreased in 28.81%, although all the
25 *Lactobacillus* spp. treatments effectively kept levels similar to the control group (Table

1 6). A decrease in broilers serum SOD levels was also observed after DON exposure,
2 and a protective effect dietary addition of yeast cell wall (YCW) was proven (JIANG et
3 al., 2014). According to Dänicke; Brezina (2013) chronic feeding of a DON-
4 contaminated diet resulted in a significantly higher bioavailability. The mild alterations
5 induced by DON on broilers liver and kidney oxidative stress may be explained by a
6 low bioavailability of this compound due to the small period of exposition (seven days).

7

8 **5. Conclusion**

9 The *Lactobacillus* spp. treatments were able to improve the intestinal health after
10 DON exposure, minimizing the intestinal morphological changes, reducing the goblet
11 cell and the intraepithelial lymphocytes count and reducing the oxidative stress damage
12 mainly on jejunum. On the liver, the treatments were also effective in maintaining the
13 morphology and reducing the oxidative stress damage produced by DON.

14 Despite all the *Lactobacillus* spp. treatments reduced DON toxicity, in general,
15 the viable treatment showed the best results. We suggest that the beneficial effects are
16 probably related to mycotoxin binding and production of detoxifying substances, once
17 protective effects were observed with the viable, heat-inactivated cells and the culture
18 supernatant. However, more studies are necessary to elucidate the mechanisms of
19 *Lactobacillus* spp. action.

20

21 **Acknowledgements**

22

23 This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de
24 Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 0389/2019. The authors
25 would like to thank Dr. Eduardo Micotti da Glória (USP-ESALQ) for DON supplying.
26 Marielen Souza and Ana Paula Bracarense receive fellowships from CNPq – Brazil
27 (308136-2018-7).

28

29 **Conflict of interest**

30 The authors declare no conflicts of interest.

1 **References**

- 2
- 3 AGUZEY, H. A.; GAO, Z.; WU, H.; CHENG, G.; WU, Z.; CHEN, J. The effects of
4 deoxynivalenol (DON) on the gut microbiota, morphology and immune system of chicken – A
5 Review. **Annals of Animal Science**, v. 19, n. 2, p. 305-318, 2019.
- 6 ANDRETTA, I.; KIPPER, M.; LEHNEN, C. R.; HAUSCHILD, L.; VALE, M. M.; LOVATTO,
7 P. A. Meta-analytical study of productive and nutritional interactions of mycotoxins in broilers.
8 **Poultry Science**, v. 90, n. 9, p. 1934-1940, 2011.
- 9 ANTONISSEN, G.; VAN IMMERSEEL, F.; PASMANS, F.; DUCATELLE, R.; JANSSENS,
10 G. P.; DE BAERE, S.; MOUNTZOURIS, K. C.; SU, S.; WONG, E. A.; DE MEULENAER, B.;
11 VERLINDEN, M.; DEVREESE, M.; HAESEBROUCK, F.; NOVAK, B.; DOHNAL, I.;
12 MARTEL, A.; CROUBELS, S. Mycotoxins deoxynivalenol and fumonisins alter the extrinsic
13 component of intestinal barrier in broiler chickens. **Journal of Agricultural and Food**
14 **Chemistry**, v. 63, n. 50, p. 1-44, 2015.
- 15 AWAD, W. A.; BÖHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E.; GHAREEB, K.; ZENTEK, J. Effect of
16 addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on
17 performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. **Poultry Science**,
18 v. 85, n. 6, p. 974-979, 2006a.
- 19 AWAD, W. A.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E.; ZENTEK, J. Effects of feeding
20 deoxynivalenol contaminated wheat on growth performance, organ weights and histological
21 parameters of the intestine of broiler chickens. **Journal of Animal Physiology and Animal**
22 **Nutrition**, v. 90, n. 1-2, p. 32-37, 2006b.
- 23 AWAD, W. A.; GHAREEB, K.; DADAK, A.; GILLE, L.; STANIEK, K.; HESS, M.; BOHM,
24 J. Genotoxic effects of deoxynivalenol in broiler chickens fed low-protein feeds. **Poultry**
25 **Science**, v. 91, n. 3, p. 550-555, 2012.
- 26 AWAD, W. A.; GHAREEB, K.; DADAK, A.; HESS, M.; BÖHM, J. Single and combined
27 effects of deoxynivalenol mycotoxin and a microbial feed additive on lymphocyte DNA damage
28 and oxidative stress in broiler chickens. **PLOS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2014.
- 29 AWAD, W. A.; RUHNAU, D.; HESS, C.; DOUPOVEC, B.; SCHATZMAYR, D.; HESS, M.
30 Feeding of deoxynivalenol increases the intestinal paracellular permeability of broiler chickens.
31 **Archives of Toxicology**, v. 93, n. 7, p. 2057-2064, 2019.
- 32 BIOMIN. **Resultados regionais da ocorrência mundial de micotoxinas até setembro 2017.**
33 2017. Available at: <[https://www.biomin.net/pt/blog-posts/resultados-regionais-da-ocorrencia-
34 mundial-de-micotoxinas-ate-setembro-2017/](https://www.biomin.net/pt/blog-posts/resultados-regionais-da-ocorrencia-mundial-de-micotoxinas-ate-setembro-2017/)>. Access at: 30/07/2019.
- 35 BONDY, G. S.; PESTKA, J. J. Immunomodulation by fungal toxins. **Journal of Toxicology**
36 **and Environmental Health**, v. 3, n. 2, p. 109-143, 2000.
- 37 BORUTOVA, R.; FAIX, S.; PLACHA, I.; GRESAKOVA, L.; COBANOVA, K.; LENG, L.
38 Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in
39 broilers. **Archives of Animal Nutrition**, v. 62, n. 4, p. 303-312, 2008.
- 40 BRACARENSE, A.-P. F. L.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; DROCIUNAS PACHECO, G.;
41 MOLL, W.-D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and
42 fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the
43 intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, n. 12, p. 1776-1786, 2012.

- 1 BROOM, L. Mycotoxins and the intestine. **Animal Nutrition**, v. 1, n. 4, p. 262-265, 2015.
- 2 CHE, Z.; LIU, Y.; WANG, H.; ZHU, H.; HOU, Y.; DING, B. The Protective Effects of
3 Different mycotoxin adsorbents against blood and liver pathological changes induced by mold-
4 contaminated feed in broilers. **Asian-Australasian Association of Animal Production**
5 **Societies**, v. 24, n. 2, p. 250-257, 2011.
- 6 CHLEBICZ, A.; ŚLIŻEWSKA, K. *In Vitro* detoxification of aflatoxin B1, deoxynivalenol,
7 fumonisins, T-2 toxin and zearalenone by probiotic bacteria from genus *Lactobacillus* and
8 *Saccharomyces cerevisiae* yeast. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10.1007/s12602-
9 018-9512-x, p. 1-13, 2019.
- 10 CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Intestinal redox biology and oxidative stress. **Seminars in Cell &**
11 **Developmental Biology**, v. 23, p. 729-737, 2012.
- 12 DÄNICKE, S.; BREZINA, U. Kinetics and metabolism of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol
13 in farm animals: Consequences for diagnosis of exposure and intoxication and carry over. **Food**
14 **and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 58-75, 2013.
- 15 EC - European Commission, 2006. Commission Recommendation 576/2006/EC of 17
16 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and
17 fumonisins in products intended for animal feeding. **Official Journal of the European Union**
18 **L 229**, 7
- 19 EL-NEZAMI, H. S.; CHREVATIDIS, A.; AURIOLA, S.; SALMINEN, S.; MYKKANEN, H.
20 Removal of common *Fusarium* toxins *in vitro* by strains of *Lactobacillus* and
21 *Propionibacterium*. **Food Additives Contaminants**, v. 19, n. 7, p. 680-686, 2002.
- 22 ESKOLA, M.; KOS, G.; ELLIOTT, C. T.; HAJŠLOVÁ, J.; MAYAR, S.; KRŠKA, R.
23 Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO
24 estimate' of 25. **Food Science and Nutrition**, v. 10.1080/10408398.2019.1658570, p. 1-17,
25 2019.
- 26 FANG, H.; ZHI, Y.; YU, Z.; LYNCH, R. A.; JIA, X. The embryonic toxicity evaluation of
27 deoxynivalenol (DON) by murine embryonic stem cell test and human embryonic stem cell test
28 models. **Food Control**, v. 86, p. 234-240, 2018.
- 29 FRANCO, T. S.; GARCIA, S.; HIROOKA, E. Y.; ONO, Y. S.; DOS SANTOS, J. S. Lactic acid
30 bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. **Journal**
31 **of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 739-748, 2011.
- 32 GHAREEB, K.; AWAD, W. A.; BOHM, J.; ZEBELI, Q. Impacts of the feed contaminant
33 deoxynivalenol on the intestine of monogastric animals: poultry and swine. **Journal of Applied**
34 **Toxicology**, v. 35, n. 4, p. 327-337, 2015.
- 35 GRENIER, B.; BRACARENSE, A. P. L.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G. D.; COSSALTER, A.
36 M.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Individual and combined effects of
37 subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisins in piglets. **Molecular Nutrition & Food**
38 **Research**, v. 55, n. 5, p. 761-771, 2011.
- 39 GUEDES, R. P.; BOSCO, L. D.; TEIXEIRA, C. M.; ARAÚJO, A. S. R.; LLESUY, S.;
40 BELLÓ-KLEIN, A.; RIBEIRO, M. F. M.; PARTATA, W. A. neuropathic pain modifies
41 antioxidant activity in rat spinal cord. **Neurochemical Research**, v. 31, n. 5, p. 603-609, 2006.

- 1 GUERRE, P. Fusariotoxins in Avian species: toxicokinetics, metabolism and persistence in
2 tissues. **Toxins**, v. 7, n. 6, p. 2289-2305, 2015.
- 3 HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35,
4 n. 5, p. 1147-1150, 2007.
- 5 INSTANES, C.; HETLAND, G. Deoxynivalenol (DON) is toxic to human colonic, lung and
6 monocytic cell lines, but does not increase the IgE response in a mouse model for allergy.
7 **Toxicology**, v. 204, n. 1, p. 13-21, 2004.
- 8 JEURISSEN, S. H.; LEWIS, F.; VAN DER KLIS, J. D.; MROZ, Z.; REBEL, J. M.; TER
9 HUURNE, A. A. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as
10 constituted by immunity, integrity, and functionality. **Current Issues in Intestinal**
11 **Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2002.
- 12 JIANG, S. Z.; LI, Z.; WANG, G. Y.; YANG, Z. B.; YANG, W. R.; ZHANG, G. G.; WU, Y. B.
13 Effects of *Fusarium* mycotoxins with yeast cell wall absorbent on hematology, serum
14 biochemistry, and oxidative stress in broiler chickens. **The Journal of Applied Poultry**
15 **Research**, v. 23, n. 2, p. 165-173, 2014.
- 16 KAER, L. V.; OLIVARES-VILLAGOMEZ, D. Development, homeostasis, and functions of
17 intestinal intraepithelial lymphocytes. **Journal of Immunology**, v. 200, n. 7, p. 2235-2244,
18 2018.
- 19 KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant
20 capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS)
21 and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and**
22 **Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 47-52, 2005.
- 23 LEE, H. J.; RYU, D. Worldwide occurrence of mycotoxins in cereals and cereal-derived food
24 products: public health perspectives of their co-occurrence. **Journal of Agricultural and Food**
25 **Chemistry**, v. 65, n. 33, p. 7034-7051, 2017.
- 26 LI, D.; YE, Y.; LIN, S.; DENG, L.; FAN, X.; ZHANG, Y.; DENG, X.; LI, Y.; YAN, H.; MA,
27 Y. Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells *in vitro*: cell-cycle arrest,
28 oxidative stress, and apoptosis. **Environmental Toxicological Pharmacology**, v. 37, n. 1, p.
29 141-149, 2014.
- 30 LI, S.; TAN, H.-Y.; WANG, N.; ZHANG, Z.-J.; LAO, L.; WONG, C.-W.; FENG, Y. The role
31 of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. **International Journal of Molecular**
32 **Sciences**, v. 16, p. 26087-26124, 2015.
- 33 LIU, J. D.; DOUPOVEC, B.; SCHATZMAYR, D.; MURUGESAN, G. R.; BORTOLUZZI, C.;
34 VILLEGAS, A. M.; APPLGATE, T. J. The impact of deoxynivalenol, fumonisins, and their
35 combination on performance, nutrient, and energy digestibility in broiler chickens. **Poultry**
36 **Science**, v. 0, p. 1-8, 2019.
- 37 MAGNOLI, A. P.; POLONI, V. L.; CAVAGLIERI, L. Impact of mycotoxin contamination in
38 the animal feed industry. **Current Opinion in Food Science**, v. 29, p. 99-108, 2019.
- 39 MAIDANA, L. G.; GEREZ, J.; PINHO, F.; GARCIA, S.; BRACARENSE, A. P. F. L.
40 *Lactobacillus plantarum* culture supernatants improve intestinal tissue exposed to
41 deoxynivalenol. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 69, n. 8, p. 666-671, 2017.

- 1 MARESCA, M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-
2 associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. **Toxins**, v. 5, n. 4, p. 784-820, 2013.
- 3 MISHRA, S.; DWIVEDI, P. D.; PANDEY, H. P.; DAS, M. Role of oxidative stress in
4 deoxynivalenol induced toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 72, p. 20-29, 2014.
- 5 MOORE, R. J. Necrotic enteritis predisposing factors in broiler chickens. **Avian Pathology**, v.
6 45, n. 3, p. 275-281, 2016.
- 7 NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian
8 thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.
- 9 OSSELAERE, A.; SANTOS, R.; HAUTEKIET, V.; DE BACKER, P.; CHIERS, K.;
10 DUCATELLE, R.; CROUBELS, S. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene
11 expression of selected oxidative stress, tight junction and inflammation proteins in broiler
12 chickens, but addition of an adsorbing agent shifts the effects to the distal parts of the small
13 intestine. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, p. 1-7, 2013.
- 14 PATERSON, R. R. M.; LIMA, N. How will climate change affect mycotoxins in food? **Food**
15 **Research International**, v. 43, n. 7, p. 1902-1914, 2010.
- 16 PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed**
17 **Science and Technology**, v. 137, n. 3, p. 283-298, 2007.
- 18 PIERRON, A.; MIMOUN, S.; MURATE, L. S.; LOISEAU, N.; LIPPI, Y.; BRACARENSE, A.-
19 P. F. L.; SCHATZMAYR, G.; HE, J. W.; ZHOU, T.; MOLL, W.-D.; OSWALD, I. P. Microbial
20 biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-
21 13, 2016.
- 22 QU, R.; JIANG, C.; WU, W.; PANG, B.; LEI, S.; LIAN, Z.; SHAO, D.; JIN, M.; SHI, J.
23 Conversion of DON to 3-epi-DON in vitro and toxicity reduction of DON *in vivo* by
24 *Lactobacillus rhamnosus*. **Food & Function**, v. 10, n. 5, p. 2785-2796, 2019.
- 25 ROCHA, T. S.; BAPTISTA, A. A. S.; DONATO, T. C.; MILBRADT, E. L.; OKAMOTO, A.
26 S.; ANDREATTI FILHO, R. L. Identification and adhesion profile of *Lactobacillus* spp. strains
27 isolated from poultry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 1065-1073, 2014.
- 28 SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl
29 groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.
- 30 SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. P. F. L.; OSWALD, I. P. Mycotoxins and oxidative stress:
31 where are we? **World Mycotoxin Journal**, v. 11, p. 113-134, 2018.
- 32 STREIT, E.; NAEHRER, K.; RODRIGUES, I.; SCHATZMAYR, G. Mycotoxin occurrence in
33 feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and
34 Asia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 12, p. 2892-2899, 2013.
- 35 STROKA, J.; GONÇALVES, C. Mycotoxins in food and feed: an overview. In: MELTON, L;
36 SHAHIDI, F, et al (Ed.). **Encyclopedia of Food Chemistry**. Oxford: Academic Press, v.1,
37 2019. p.401-419. ISBN 978-0-12-814045-1.
- 38 SWATSON, H. K.; GOUS, R.; IJI, P. A.; ZARRINKALAM, R. Effect of dietary protein level,
39 amino acid balance and feeding level on growth, gastrointestinal tract, and mucosal structure of
40 the small intestine in broiler chickens. **Animal Research**, v. 51, p. 501-515, 2002.

- 1 TAHEUR, F. B.; KOUIDHI, B.; AL QURASHI, Y. M. A.; BEN SALAH-ABBÈS, J.;
2 CHAIEB, K. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and
3 enzymes. **Toxicon**, v. 160, p. 12-22, 2019.
- 4 NEVEL, C. J. V.; DECUYPERE, J. A.; DIERICK, N. A.; MOLLY, K. Incorporation of
5 galactomannans in the diet of newly weaned piglets: effect on bacteriological and some
6 morphological characteristics of the small intestine. **Archives in Animal Nutrition**, v. 59, p.
7 123-138, 2005.
- 8 WANG, A.; HOGAN, N. S. Performance effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on broiler
9 chickens: Influences of timing and duration of exposure. **Animal Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 32-40,
10 2019.
- 11 WATANUKI, H.; OTA, K.; CITRA MALINA A. R. TASSAKKA, A.; KATO, T.; SAKAI, M.
12 Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on carp, *Cyprinus carpio*. **Aquaculture**,
13 v. 258, p. 157-163, 2006.
- 14 WU, S.; LIU, Y.; DUAN, Y.; WANG, F.; GUO, F.; YAN, F.; YANG, X.; YANG, X. Intestinal
15 toxicity of deoxynivalenol is limited by supplementation with *Lactobacillus plantarum* JM113
16 and consequentially altered gut microbiota in broiler chickens. **Journal of Animal Science**
17 **Biotechnology**, v. 9, p. 74, 2018.
- 18 XU, L.; EICHER, S. D.; APPLGATE, T. J. Effects of increasing dietary concentrations of
19 corn naturally contaminated with deoxynivalenol on broiler and turkey poult performance and
20 response to lipopolysaccharide. **Poultry Science**, v. 90, n. 12, p. 2766-2774, 2011.
- 21 YANG, X.; LI, L.; DUAN, Y.; YANG, X. Antioxidant activity of *Lactobacillus plantarum*
22 JM113 *in vitro* and its protective effect on broiler chickens challenged with deoxynivalenol.
23 **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 2, p. 837-846, 2017.
- 24 YU, Y.-H.; HSIAO, F. S.-H.; PROSKURA, W. S.; DYBUS, A.; SIAO, Y.-H.; CHENG, Y.-H.
25 An impact of deoxynivalenol produced by *Fusarium graminearum* on broiler chickens. **Journal**
26 **of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 102, n. 4, p. 1012-1019, 2018.
- 27 YUNUS, A. W.; BLAJET-KOSICKA, A.; KOSICKI, R.; KHAN, M. Z.; REHMAN, H.;
28 BOHM, J. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: intestinal development, absorptive
29 functionality, and metabolism of the mycotoxin. **Poultry Science**, v. 91, n. 4, p. 852-861, 2012.
- 30 ZHAI, Y.; HU, S.; ZHONG, L.; LU, Z.; BIE, X.; ZHAO, H.; ZHANG, C.; LU, F.
31 Characterization of deoxynivalenol detoxification by *Lactobacillus paracasei* LHZ-1 isolated
32 from yogurt. **Journal of Food Protection**, v. 82, n. 8, p. 1292-1299, 2019.

33

34

35

36

37

38

7. CONCLUSÃO

O fornecimento de dieta contaminada com DON ($19,3 \text{ mg kg}^{-1}$) a frangos de corte entre 7-14 dias de vida induz efeitos deletérios sobre a morfologia e morfometria intestinal. DON induz o estresse oxidativo no intestino e fígado, entretanto os níveis de EROs e antioxidantes não se alteram no rim.

DON aumenta a contagem de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais no intestino delgado de frangos de corte alimentados com dieta contaminada ($19,3 \text{ mg kg}^{-1}$).

O fornecimento via oral do pool de *Lactobacillus* spp. viável, inativado e sobrenadante da cultura foi capaz de reduzir os efeitos tóxicos de DON sobre a morfologia, contagem de células caliciformes e linfócitos intraepiteliais intestinais. Também diminuiu o estresse oxidativo intestinal e hepático.

A futura utilização do pool *Lactobacillus* spp. viável, inativado e sobrenadante da cultura na avicultura comercial é uma alternativa plausível. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de identificar os mecanismos de ação das diferentes formas de apresentação do pool de *Lactobacillus* spp. frente ao DON.


17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

1
2
3
4

ANEXOS

ANEXO I

Formulário de aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) – UEL.

 UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 155/2018 **Londrina, 24 de Setembro de 2018.**

Prezado (a) professor (a)

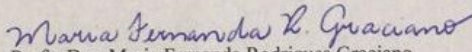
Certificamos que o projeto intitulado: “Avaliação do efeito de *Lactocacillus spp* na saúde intestinal de frangos de corte alimentados com ração contaminada com desoxinivalenol e desafiados com *Clostridium perfringens* ” protocolo CEUA nº 12433.2018.03 sob a responsabilidade de **Ana Paula Frederico R. L. Bracarense**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **24/09/2018**.

O objetivo do projeto é avaliar a ação de *Lactobacillus spp.* e metabólitos sobre a resposta imune e saúde intestinal de frangos de corte alimentados com dieta contaminada com desoxinivalenol e desafiados por *Clostridium perfringens*, como também avaliar o efeito do aditivo comercial N-Force® sobre a saúde intestinal de frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens*. GI:3.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/10/2018 a 31/10/2018
Espécie/ linhagem/ raça	Ave/Frango de corte/Ross
Nº de animais	359
Peso/ Idade	40g-1500g/1-23dias
Sexo	Macho
Origem	Incubatório de frangos de corte
Amostras a serem coletadas	Sangue, Fluido intestinal, Intestinos, Conteúdo Cecal, Órgãos (bursa, timo, baço, fígado, rins)

Cumprе orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.


Prof. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr (a). Ana Paula Frederico R L Bracarense
Responsável pelo projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/CCA

C/C para a Chefia do Depto de Medicina Veterinária Preventiva
C/C para a Direção de Centro do CCA

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

5

ANEXO II

1
2
3Instruções aos autores revista *Food and Chemical Toxicology*.

FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.2
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.5



DESCRIPTION

Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, that publishes original research articles and reviews on toxic effects, in animals and humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety. Areas such as safety evaluation of novel foods and ingredients, biotechnologically-derived products, and nanomaterials are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on inter-relationships between nutrition and toxicology and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the 3 Rs.

The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. Studies should address at least one of the following: Adverse physiological/biochemical, or pathological changes induced by specific defined substances New techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology Mechanisms underlying toxic phenomena Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability

Authors must clearly and briefly identify what novel toxic effect (s) or toxic mechanism (s) of the chemical are being reported and what their significance is in the abstract. Furthermore, sufficient doses should be included in order to provide information on NOAEL/LOAEL values.

Manuscripts describing research involving the following areas will not be considered: materials/substances of only local interest materials/substances for which the chemical composition is not clearly defined only pharmacological properties, or potentially beneficial effects using *in vitro* or *in vivo* systems chemical analyses of toxins in foods without addressing the toxic implication to humans [risk assessment should be included] unrealistic human doses, inappropriate route of exposure, or *in vitro* experiments that do not reflect serum levels in humans

FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the manuscript is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Co-authors should be individuals who have contributed substantially to the content of the papers. All authors must declare any potential conflict of interest and all financial support.

4