



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KARINA MARIA BASSO

**EFEITOS DO DESOXINIVALENOL E DO DE-EPOXI-  
DESOXINIVALENOL EM RATOS E SUÍNOS**

---

Londrina  
2015

KARINA MARIA BASSO

**EFEITOS DO DESOXINIVALENOL E DO DE-EPOXI-  
DESOXINIVALENOL EM RATOS E SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal (Área de Concentração em Sanidade  
Animal) da Universidade Estadual de Londrina,  
como requisito parcial a obtenção do título de  
Doutora em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula F.R.L.  
Bracarense.

Londrina  
2015

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B322 Basso, Karina Maria.

Efeitos do desoxinivalenol e do de-epoxi-desoxinivalenol em ratos e suínos /  
Karina Maria Basso - Londrina, 2015.  
57 f.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.  
Inclui bibliografia.

1. Micotoxinas – Teses. 2. Imunossupressão – Teses. 3. Patologia  
experimental – Teses. I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro.  
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa  
de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:616

KARINA MARIA BASSO

**EFEITOS DO DESOXINIVALENOL E DO DE-EPOXI-  
DESOXINIVALENOL EM RATOS E SUÍNOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal da Universidade Estadual de  
Londrina, como requisito parcial à obtenção do título  
de doutora em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa.Dra. Ana Paula F.R.L.  
Bracarense  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Ana Angelita Sampaio Baptista  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Giovana Wingeter Di Santis  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Joice Sifuentes dos Santos  
Universidade do Norte do Paraná - UNOPAR

---

Profa. Dra. Karina Keller Marques da Costa Flaiban  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de Outubro de 2015.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, base da minha formação; alicerce de tudo que construí. Meus pais Vera e Sebastião e irmãos, Luciano, Fernando, Camila, minha cunhada Micaela, exemplos de dedicação e ensinamentos, que tudo na vida é possível com determinação e respeito. O meu muito obrigada ao meu esposo José, foram muitos altos e baixos superados devido a sua participação. Pela paciência, coerência e firmeza.

A minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula F.R.L. Bracarense, por todo o tempo de dedicação, paciência e ensinamentos, para realização deste trabalho.

Aos amigos novos e antigos, por todas as conversas e auxílio na realização do doutorado. Meu carinho e admiração vão sempre permanecer, cada um ao seu modo, muito obrigada Leticia Yamasaki, Claudia Boselli, Thais Correa, Leila Madina. Rogério Marcasso, Elisangela Olegário, Alcides Branco, Victor Marutami, Renata Madureira.

A toda a equipe do Laboratório de Anatomia Veterinária, residentes e técnicos.

A Universidade Estadual de Londrina e ao programa de Pós graduação em Ciência Animal.

A Capes pelo apoio financeiro.

“O segredo do sucesso é a constância do propósito”

*Benjamim Disraeli.*

BASSO, Karina Maria. **Efeitos do desoxinivalenol e do de-epoxi-desoxinivalenol em ratos e suínos**. 2015. 57f. Tese (Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina PR, 2015.

## RESUMO

O desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina de grande impacto negativo à saúde humana e animal. O conhecimento dos efeitos do DON ao organismo pode auxiliar na elaboração de políticas públicas para determinação dos níveis de contaminação de micotoxinas nos alimentos. O DON pode sofrer biotransformação bacteriana e originar o De-epoxi-desoxinivalenol (DOM-1), no entanto, até o momento pouco se sabe sobre a toxicidade do DOM-1 em relação ao DON. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a toxicidade de DON utilizando ratos como modelo animal e comparar a toxicidade de DON e DOM-1 em suínos, por meio de análise histopatológica e imunoistoquímica. Foram usados 50 ratos Wistar divididos em grupos intoxicados com doses de  $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de alimento durante 4 semanas e  $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de alimento durante uma, duas e quatro semanas. Após os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados, e coletado o fígado, baço e linfonodos mesentéricos. Foi realizada a avaliação histopatológica por meio de escore lesional de cada um dos órgãos analisados. Foi realizada também a imunoistoquímica, que permitiu a avaliação do índice apoptótico (Caspase-3) no fígado, baço e linfonodos mesentéricos, e avaliação do índice de proliferação celular (PCNA) no fígado. Os resultados histopatológicos mostraram que a intoxicação por períodos mais longos e maior dose de DON ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$  por quatro semanas) proporcionaram severas alterações morfológicas no fígado dos ratos, o que pode favorecer o desenvolvimento de alterações negativas em outros órgãos do indivíduo. A análise imunoistoquímica revelou não haver marcação para apoptose no fígado, enquanto que no baço e linfonodos dos ratos foi observado aumento no índice apoptótico após a intoxicação por período mais longo e maior dose ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$  por quatro semanas), enquanto que nas doses de  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  por quatro semanas e  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  por uma ou duas semanas o índice apoptótico foi semelhante ao grupo controle. Esse aumento do índice apoptótico confirma o efeito imunossupressor do DON, dose e tempo dependentes. A avaliação e comparação da toxicidade do DON e DOM-1 foi realizada em suínos que receberam as micotoxinas em diferentes doses e tempos de intoxicação. Foram utilizados suínos de 24 dias de vida que receberam durante 14 dias (2 vezes ao dia), solução tampão (grupo controle), DON ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corporal) e DOM-1 ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corporal), e durante 28 dias, solução tampão (grupo controle), DON ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corporal) e DOM-1 ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$  peso corporal). Após o período experimental, os animais foram eutanasiados e coletados fígado, baço, linfonodo mesentérico e intestino (jejuno e íleo). A avaliação histopatológica foi realizada por meio de escore lesional. Os resultados histopatológicos comprovaram a toxicidade tempo dependente do DON nos quatro órgãos analisados e mostraram que a ingestão de  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  por 14 dias ou  $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$  por 28 dias de DOM-1 ocasionaram alterações morfológicas mais discretas no fígado, linfonodos mesentéricos e intestino dos suínos. O baço apresentou alterações morfológicas significativas somente após 28 dias de exposição ao DOM-1 ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ ). De maneira geral, o metabólito mostrou menor potencial tóxico ao organismo dos suínos. A micotoxina nativa é tóxica ao organismo de ratos e suínos e foi capaz de desencadear alterações morfológicas graves nos diferentes órgãos avaliados. O metabólito DOM-1 causou alterações morfológicas mais leves quando comparado à molécula nativa.

**Palavras-chave:** Proliferação celular, apoptose, micotoxina.

BASSO, Karina Maria. **Effects of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in rats and swines. 2015.** 57p. Thesis (Pos-Graduate in Animal Science) - University of Londrina, Londrina PR, 2015.

## ABSTRACT

Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin of great negative impact to human and animal health. Knowledge of effects of DON in the organism can assist the development of public policies for determination of contamination levels by this mycotoxin in food. DON can suffer bacterial biotransformation and lead the De-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1), which toxic potential to the organism can be lower than the DON, however, currently little is known about the toxicity of the DOM-1. Thus, the objective of this study was to evaluate the toxicity of DON, using rats as animal model and evaluate and compare the toxicity of DON and DOM-1 in swine through histopathological and immunohistochemical analysis. Were used 50 rats Wistar divided into groups intoxicated with doses of  $2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$  feed for four weeks and  $10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$  feed during one, two and four weeks. After the experimental period, the animals were euthanized, and collected the liver, spleen and mesenteric lymph nodes. Histopathological evaluation was performed by means of lesion score of each organs analyzed. It was also performed immunohistochemistry to evaluate the apoptotic index (Caspase-3) in the liver, spleen and mesenteric lymph nodes, and evaluation of cell proliferation index (PCNA) in the liver. The histopathological results showed that the intoxication for longer periods and higher doses of DON ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$  for four weeks) caused severe morphological alterations in the liver of mice, which may favor the development of changes in several organs. Immunohistochemical analysis revealed no markup for apoptosis in the liver whereas in the spleen and lymph nodes of the rats was observed increase of apoptotic index after intoxication for longer period and higher dose ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$  for four weeks), while in doses of  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  for four weeks and  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  for one or two weeks the apoptotic index was similar to the control group. This increase in apoptotic index confirms the immunosuppressive effects of DON, dose-dependent and time-dependent. The evaluation and comparison of the toxicity of DON and DOM-1 was carried out in pigs that received mycotoxins in different doses and time of intoxication. Were used swine of 24 days old that received for 14 days (two times per day), buffer solution (control group), DON ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight), and DOM-1 ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight), and during 28 days, buffer solution (control group), DON ( $0.15 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight) and DOM-1 ( $0.14 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight). After the experimental period, the animals were euthanized and was collected liver, spleen, mesenteric lymph nodes and intestine (jejunum and ileum). Histopathological evaluation was performed by means of lesion score. The histopathological results showed a time-dependent toxicity of DON in the four organs examined and showed that the intake of  $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  for two weeks or  $0.14 \text{ mg kg}^{-1}$  for four weeks of DOM-1 caused milder morphological changes in the liver, intestine and mesenteric lymph nodes of pigs. The spleen showed significant morphological changes only after four weeks of exposure to DOM-1 ( $0.14 \text{ mg kg}^{-1}$ ). In general, the metabolite showed less potential toxic to the organism of pigs. The native mycotoxin is toxic to the rat and pig organisms and was able to trigger severe morphological changes at the different organs evaluated. The metabolite DOM-1 caused more mild morphological changes when compared to the native molecule.

**Key words:** Cell proliferation, apoptosis, mycotoxin.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Estrutura química do desoxinivalenol..... 14
- Figura 2.2.** Estrutura química do De-epoxi-desoxinivalenol..... 20
- Figure 4.1.** Effects of DON on the liver of rats submitted to different treatments with DON. Group I: control; Group II: 2 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 30 days; Group III: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 7 days; Group IV: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 14 days; Group V 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON during for 30 days. (A) Disorganization of hepatic cords and cytoplasmatic vacuolation (group V) (H.E., 40X); (B) Megalocytosis and nuclear degeneration (group V). (H.E., 40X); (C) Mild immunostaining for PCNA in the liver of rats exposed to DON (group III); (D) Strong and diffuse immunostaining for PCNA in the liver of rats exposed to DON (group II). (E) Mean lesional scores on liver. (F) Mean number of..... 32
- Figure 4.2.** Effects of DON on lymphoid organs of rats submitted to different treatments with DON. Group I: control; Group II: 2 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 30 days; Group III: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 7 days; Group IV: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 14 days; Group V 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON during for 30 days. (A) Mean lesional scores on spleen and (B) mesenteric lymph nodes. (C) Mean number of immunostained cells for caspase-3 in spleen and (D) lymph nodes. Different letters show significant differences by Tukey's test (p<0.05). (E) Mild immunostaining for caspase-3 in the spleen, group II (2 mg kg<sup>-1</sup> for 30 days) (F) Diffuse immunostaining for caspase-3 in the lymph node, group V (10 mg kg<sup>-1</sup> for 30 days) ..... 34
- Figura 5.1.** Comparação entre as médias do escore lesional de fígado, linfonodo e baço de suínos intoxicados com DON e DOM-1 em diferentes doses e tempos. (A) Fígado: 14 dias; (B) Fígado: 28 dias; (C) Linfonodo: 14 dias. (D) Linfonodo 28 dias; (E) Baço: 14 dias; (F) Baço: 28 dias. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (p≤0.05). U.A: Unidades Arbitrárias ..... 44
- Figura 5.2.** (A) Fígado de suíno intoxicado com DON 28 dias (0,14 mg kg<sup>-1</sup>): vacuolização citoplasmática e megalocitose (setas) (HE 100X); (B) Fígado de suínos intoxicados com DOM-1 28 dias (0,14 mg kg<sup>-1</sup>): hepatócitos normais (HE 100X); (C) Baço de suíno intoxicado com DON 28 dias (0,14

mg kg<sup>-1</sup>): depleção de folículos linfóides (HE 20X); (D) Jejunó de suíno intoxicado com DON 28 dias (0,14 mg kg<sup>-1</sup>): atrofia de vilosidades (HE 20X) ..... 45

**Figura 5.3.** Comparação entre as médias do escore lesional de intestino de suínos intoxicados com DON e DOM-1 em diferentes doses e tempos. (A) Jejunó:14 dias; (B) Jejunó: 28 dias; (C) Íleo: 14 dias. (D) Íleo: 28 dias. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). U.A: Unidades Arbitrárias ..... 46

**Figura 5.4.** Comparação entre as médias da altura das vilosidades do intestino de suínos intoxicados com DON e DOM-1 em diferentes doses e tempos. (A) Jejunó: 14 dias; (B) Jejunó: 28 dias; (C) Íleo: 14 dias. (D) Íleo: 28 dias. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) ..... 47

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	11
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1. DESOXINIVALENOL	14
2.2. EFEITOS DE DON EM MODELOS ANIMAIS: RATOS E SUÍNOS	16
2.3. DETOXIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS	18
<b>3. OBJETIVOS</b>	25
3.1. OBJETIVO GERAL	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
<b>4. SYSTEMIC EFFECTS OF DEOXYNIVALENOL IN RATS AT DIFFERENT DOSES AND EXPOSURE TIME</b>	27
Abstract	27
4.1. INTRODUCTION	27
4.2. MATERIAL AND METHODS	29
4.2.1. Animals and Experimental Design	29
4.2.2. Histopathological and Immunohistochemical Assays	29
4.2.3. Statistical Analysis	30
4.3. RESULTS	30
4.3.1. Effects of DON on Liver	30
4.3.2. Effects of DON on Lymphoid Organs	33
4.4. DISCUSSION	34
<b>5. TOXICIDADE DE DESOXINIVALENOL E DO METABÓLITO DE-EPOXI-DESOXINIVALENOL EM SUÍNOS – ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS</b>	40
5.1. INTRODUÇÃO	41
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	42
5.2.1. Animais e Delineamento Experimental	42
5.2.2. Análises Histopatológicas e Morfométricas	43

5.2.3. Análise Estatística .....	43
5.3. RESULTADOS .....	43
5.4. DISCUSSÃO .....	47
5.5. CONCLUSÕES .....	50
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>53</b>
Anexo I .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

Desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida por fungos do gênero *Fusarium* spp., comumente encontrado em plantas ou grãos, sobretudo em trigo de regiões mais frias (Mallmann e Dilkin, 2011; Rodrigues e Naehrer, 2012), responsável por diversos efeitos deletérios ao organismo animal. Em doses crônicas, promove redução do desempenho zootécnico (Minami et al., 2004; Goyarts et al., 2006), enquanto que em intoxicações agudas pode-se observar sinais de desconforto abdominal, sialorreia, diarreia, êmese e anorexia (Pestka et al., 1987; Riley et al., 2001).

O DON pode sofrer biotransformações e originar metabólitos como o De-epoxi-Desoxinivalenol (DOM-1). Essa transformação altera a conformação da molécula e promove a retirada do oxigênio ligado ao grupo epóxi, reduzindo a polaridade da molécula e possivelmente seu efeito tóxico ao organismo (Berthiller et al., 2013).

De forma sistêmica, a intoxicação por DON em ratos (após ingestão de doses  $>10$  mg kg<sup>-1</sup> até 100 mg kg<sup>-1</sup>) promove a redução do peso de órgãos linfóides, em decorrência de atrofia dos folículos linfóides (Forsell et al., 1987; Robbana-Barnat et al., 1988) e a ingestão oral de baixas doses por longos períodos (2 mg L<sup>-1</sup> de água por 36 dias) ocasionam redução no peso do baço e falha na resposta imunológica após vacinação (Choi et al., 2013). No intestino de suínos, a ingestão de DON determina redução na expressão das junções celulares, indicando que a ingestão crônica de baixas doses dessas micotoxinas induz lesões teciduais, e ainda é capaz de modular a contagem de células imunológicas, bem como a síntese de citocinas, o que pode favorecer a infecções por agentes patogênicos entéricos (Bracarense et al., 2012). Além disso, suínos intoxicados com doses crônicas de DON (1,5 mg kg<sup>-1</sup> por 28 dias), desenvolvem lesões hepáticas graves (Gerez et al., 2015), que podem interferir no funcionamento e metabolização hepática.

Em contrapartida, a avaliação de DOM-1 a partir de cultivo celular de linhagens linfocíticas, não revelou o potencial indutor de apoptose e necrose, após sete e 24 horas de incubação com doses de 5 e 10 μM (Nasri et al., 2006).

Dessa forma, o conhecimento dos efeitos sistêmicos de DON ao organismo animal pode auxiliar a elaboração de políticas públicas para determinação dos níveis de contaminação dessa micotoxina nos alimentos. A biotransformação do DON em DOM-1 pode ser um meio de reduzir os efeitos deletérios dessa micotoxina, no entanto, pouco se sabe sobre a toxicidade de DOM-1 ao organismo animal. Assim, o objetivo da tese foi avaliar os efeitos

do DON em diversos órgãos de ratos e suínos após diferentes doses e tempos de intoxicação e a comparar a toxicidade do metabólito DOM-1 em relação à molécula nativa.

#### REFERÊNCIAS

BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: A review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, p. 165-183, 2013.

BRACARENSE, A. P. F. L. et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition** v. 107, p. 1776–1786, 2012.

CHOI, B.-K. et al. Effects of oral deoxynivalenol exposure on immune-related parameters in lymphoid organs and serum of mice vaccinated with porcine parvovirus vaccine. **Mycotoxin Research**, v. 29, p. 185–192, 2013.

FORSELL, J. H. et al. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3FI mouse **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 155-162, 1987.

GEREZ, J. R. et al. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, p. 89–98, 2015.

GOYARTS, T. et al. Effect of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 858–867, 2006.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Mycotoxin and mycotoxicosis in swine**. Santa Maria: LAMIC, 2011.

MINAMI, L. et al. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 207-224, 2004.

NASRI, T. et al. Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 20 p. 832–840, 2006.

PESTKA, J. J.; LIN, W. S.; MILLER, E. R. Emetic activity of trichothecenes 15-acetyldeoxynivalenol in pigs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, p. 855-858, 1987.

RILEY, R. T. et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Research Triangle Park**, v. 109, p. 301-308, 2001.

ROBBANA-BARNAT, S. et al. Immunosuppressive Properties of Deoxynivalenol. **Toxicology**, v. 48, p. 155-166, 1988.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed **Toxins**, v. 4, p. 663-675, 2012.

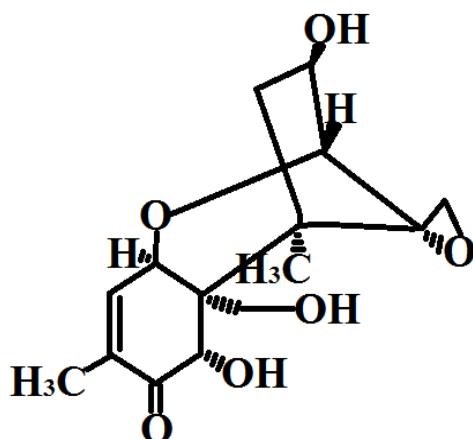


## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. DESOXINIVALENOL

Desoxinivalenol (DON, Figura 2.1) é uma micotoxina pertencente ao grupo dos tricotecenos, produzida pelo fungo *Fusarium graminearum* (Kushiro, 2008) e *Fusarium culmorum* (Pestka e Smolinski, 2005). Dentre os tricotecenos há mais de 180 micotoxinas com estruturas químicas semelhantes e presentes no meio ambiente. O *Fusarium* spp. cresce em plantas e grãos, com alta incidência em trigo, principalmente em regiões mais frias (Mallmann e Dilkin, 2011; Rodrigues e Naehrer, 2012).

**Figura 2.1.** Estrutura química do desoxinivalenol.



Fonte: Maresca (2013).

A contaminação fúngica e a consequente produção de micotoxinas começam na lavoura e grãos armazenados (Placinta et al., 1999). Altos níveis de contaminação de DON já foram registrados em diversos países: entre 2009 e 2011, 59% de 7.049 amostras de cereais de milho, farelo de soja, soja, trigo, grãos secos e destilados, provenientes da América, da Europa, da Ásia e da Oceania, estavam contaminados com DON, com valores variando de 0,256 a 49,307 mg kg<sup>-1</sup> (Rodrigues e Naehrer, 2012). No Brasil, os níveis de contaminação também se mostram altos em arroz, trigo e cevada, com índices de 14,21, 24,35 e 2,43 mg kg<sup>-1</sup> de DON, respectivamente (Mallmann e Dilkin, 2011). Outro levantamento mostrou valores médios de DON no trigo de 0,32 mg kg<sup>-1</sup> (Santos et al., 2011).

Atualmente, o consumo humano de DON varia com a dieta, como exemplo, a estimativa de consumo diário dessa micotoxina é de 0,00078 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de peso corporal na dieta da população africana, e de 0,0024 mg kg<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup> de peso corporal na dieta da

população do Oriente Médio (WHO, 2002) sendo que o limite máximo tolerável proposto para humanos é de  $0,001 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$  de peso corporal (Maresca e Fantini, 2010). As concentrações de micotoxinas que a população do Oriente Médio está exposta preocupam, pois estão muito acima daquelas consideradas como seguras para a integridade da saúde humana.

Nesse sentido, os países desenvolvidos apresentam políticas e regulamentações mais rigorosas para o controle de micotoxinas em alimentos. Já em países em desenvolvimento, a exposição dos humanos às micotoxinas pode contribuir para a redução da expectativa de vida, devido à falta de segurança alimentar, associada à pobreza e desnutrição (Williams et al., 2004).

No Brasil, produtos como leite, sucos, café, dentre outros alimentos comercializados, devem respeitar um limite máximo de micotoxinas, determinado pela Resolução RDC 07/2011, publicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). A Anvisa propõe limites máximos de DON de  $0,75 \text{ mg kg}^{-1}$  para arroz beneficiado e derivados e de  $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$  para alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância) (Anexo I).

A ampla distribuição associada à alta toxicidade das micotoxinas reafirma a necessidade de esclarecer os efeitos deletérios ao organismo animal e humano, a fim de amparar essas legislações para o controle de contaminação. Os efeitos do DON variam de acordo com a dose e a frequência da ingestão, cujas intoxicações podem ser classificadas como aguda e crônica (Pestka et al., 2004).

A forma aguda é caracterizada pela ingestão de doses elevadas com rápida manifestação de sinais clínicos como desconforto abdominal, sialorreia, diarreia, êmese e anorexia (Pestka et al., 1987; Riley et al., 2001), oferecendo risco à vida do indivíduo. Dose única de  $28 \text{ mg kg}^{-1}$  de DON em ratos é capaz de ocasionar alterações hepáticas graves com manifestação de sinais clínicos (Rizzo et al., 1998). A ingestão crônica é caracterizada pela ingestão de pequenas doses por períodos prolongados e, frequentemente, não induz a sinais clínicos específicos, contudo, ocasiona perdas econômicas significativas na produção animal (Santin et al., 2000; Santúrio, 2000), sobretudo pela redução do desempenho zootécnico (Minami et al., 2004; Goyarts et al., 2006). Em ratos, o desenvolvimento de quadro crônico de intoxicação com DON foi observado após ingestão de  $7,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal via oral durante 18 semanas (Arnold et al., 1986). Em suínos o quadro de intoxicação crônica causado por DON foi observado após ingestão de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  durante 28 dias (Gerez et al., 2015) e doses de  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  de DON durante cinco semanas (Bracarense et al., 2012).

Nas células, o mecanismo de ação de DON está relacionado à inibição da síntese proteica, uma vez que se liga à subunidade 60S dos ribossomos, inibindo a *peptil-transferase* (Feinberg e Mclaughlin, 1989), interferindo, desse modo, na fase de alongamento/terminação da síntese proteica (Ehrlich e Daige, 1985). O estresse ribotóxico nas células, ocasionado pela ingestão de baixas doses de DON, ativa as vias de sinalização das *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) levando ao aumento do índice apoptótico, enquanto doses elevadas de DON ativam o p38, levando à inibição da síntese de proteína (Lowell, 2004). A ativação das MAPKs associadas a alteração ribossomal interferem na fosforilação necessária para a transcrição de RNAm e conseguinte tradução (Pestka et al., 2008).

A inibição proteica ocasionada pela ingestão de altas doses de DON induz, no sistema nervoso, alterações do aminoácido triptofano e, conseqüentemente, na síntese de serotonina. A elevação dos níveis de serotonina no sistema nervoso, por sua vez, resulta em anorexia, sinal clínico evidente em animais intoxicados de maneira aguda (Riley et al., 2001; Pestka et al., 2004).

A redução no *status* imunitário dos animais após ingestão de DON é decorrente da inibição da síntese proteica com conseqüente depleção dos folículos linfoides, uma vez que a micotoxina atua em tecidos com alta capacidade de renovação celular como o linfóide e hematopoiético (Pinton et al., 2010).

O mecanismo de ação de DON é conhecido, no entanto os efeitos ao organismo animal e humano ainda são discutidos na literatura. Nesse sentido, métodos que permitam identificar os efeitos deletérios da micotoxina ao organismo podem auxiliar no estabelecimento de limites máximos de contaminação permitidos em alimentos. Para este fim, nos últimos anos, estudos têm sido realizados em modelos animais, como ratos e suínos (Guilloteau et al., 2010; Escrivá et al., 2015). Os resultados, a partir de modelos animais, são satisfatórios e fundamentais na busca do entendimento dos efeitos decorrentes de intoxicações por micotoxinas (Kolf-Clauw et al., 2009; Guilloteau et al., 2010).

## 2.2. EFEITOS DE DON EM MODELOS ANIMAIS: RATOS E SUÍNOS

Ratos e suínos são amplamente utilizados como modelo em experimentação animal. Os ratos predominam nos estudos em diversas áreas como farmacologia, cirúrgica e nutrição, devido ao fácil manejo (Escrivá et al., 2015). Já o interesse pelos suínos, como modelo animal, ocorre devido à similaridade do trato gastrointestinal ao de humanos, em

aspectos como digestão, absorção e metabolismo (Guilloteau et al., 2010), tempo de transporte pelo trato gastrointestinal, transporte de íons e motilidade intestinal (Swindle e Smith, 1998).

Em humanos, a ingestão de DON desencadeia efeitos imunossupressores (Pitt, 2000; Pestka et al., 2004; Mallmann e Dilkin, 2011). Uma maneira possível de avaliar os efeitos deletérios de DON ao organismo humano é o cultivo celular de linhagens de carcinoma de colón (Sergent et al., 2006). No entanto, já foi comprovado que há diferenças na resposta do organismo ao DON, de acordo com a fase de maturação das linhagens celulares, assim como o estado fisiológico das células (Sahu et al., 2010). Dessa forma, a viabilidade de utilizar modelos laboratoriais, juntamente com a impossibilidade de estudos em seres humanos, faz dos ratos e suínos modelos importantes para a avaliação da toxicidade de micotoxinas ao organismo animal e humano (Randall et al., 2011).

Ratos intoxicados com DON, em doses de 10 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal apresentaram redução no peso do baço e timo, em decorrência de atrofia dos folículos linfóides, de maneira dose dependente (Forsell et al., 1987; Robbana-Barnat et al., 1988).

Doses crônicas de 7,5 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal durante 18 semanas administradas em ratos, desencadearam depleção linfóide em baço e linfonodo (Arnold et al., 1986), enquanto doses menores, por período de 36 dias (2 mg L<sup>-1</sup>), ocasionaram redução no peso do baço e alteração na resposta imunológica após vacinação. A redução na resposta imune ocorre por modulação de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta imunológica às doenças infecciosas (Choi et al., 2013).

Em suínos, a ingestão de DON ocasiona redução na expressão das proteínas das junções celulares do intestino, como E-caderina e claudina, indicando que a ingestão crônica de baixas doses dessa micotoxina induz a lesões teciduais, sendo capaz de modular a contagem de células imunológicas, bem como a síntese de citocinas, o que pode favorecer as infecções locais ou sistêmicas por agentes entéricos (Bracarense et al., 2012).

Suínos intoxicados com doses crônicas de DON (1,5 mg kg<sup>-1</sup> por 28 dias), desenvolveram lesões hepáticas como desorganização trabecular, vacuolização citoplasmática e megalocitose (Gerez et al., 2015), sendo estas alterações capazes de interferir no funcionamento e metabolização hepática. Doses de 0,014, 0,071 e 0,355 mg kg<sup>-1</sup>, durante três vezes por semana em um período de um mês, reduziram a capacidade de metabolização hepática de substâncias endógenas e exógenas (Gouze et al., 2006).

Os estudos com modelos animais mostram que DON é absorvido pelo intestino, excretado pela urina e tem efeito negativo em tecidos de proliferação rápida (Maresca, 2013; Gerez et al., 2015). Essa micotoxina tem capacidade de atuar sob o revestimento do trato gastrointestinal, levando a um decréscimo da função absorptiva ou de barreira física, e na capacidade de renovação celular no epitélio intestinal, afetando a permeabilidade paracelular e transcelular (Pinton et al., 2010; Mallmann e Dilkin, 2011). Doses de  $12 \text{ mg kg}^{-1}$  desencadeiam anorexia grave (Miller et al., 1983), favorecendo a invasão de patógenos e uma possível disseminação sistêmica (Bouhet e Oswald, 2005). Além disso, a ingestão de DON promove efeitos deletérios em órgãos como fígado, baço e linfonodos, nos quais desencadeia alterações estruturais e possivelmente funcionais (Gerez et al., 2015).

Os resultados obtidos a partir de modelos animais expõe a complexidade da ação do DON ao organismo, comprovando que essa micotoxina tem potencial deletério, capaz de favorecer a infecção por microorganismos, assim como reduzir a capacidade imunitária dos indivíduos. Existem diferenças entre a metabolização de acordo com a espécie em estudo, no entanto, trabalhos com linhagens de hepatócitos provenientes de ratos, camundongos e seres humanos comprovaram a toxicidade do DON nas três espécies de maneira dose dependente (Sahu et al., 2010), o que permite a avaliação em modelos animais e a extrapolação dos resultados a fim de que, futuramente, seja possível estabelecer níveis toleráveis de contaminação de micotoxinas em produtos destinados ao consumo humano.

### 2.3. DETOXIFICAÇÃO DE MICOTOXINAS.

O mecanismo de ação de DON é bem estabelecido, no entanto, há muito que se entender sobre as lesões causadas ao organismo humano e animal, o que motivaram inúmeras pesquisas nos últimos anos, acerca do desenvolvimento de medidas preventivas às micotoxicoses em seres humanos, e possíveis métodos de controle ou redução dessa substância em cereais e rações destinadas para a produção animal (Mallmann e Dilkin, 2011).

No campo, várias práticas agrícolas, incluindo a aplicação de produtos químicos, pode prevenir e reduzir infecções fúngicas nas culturas. No entanto, mesmo as melhores estratégias não são eficazes para erradicar completamente a contaminação por micotoxinas, assim como sua presença na matéria-prima destinada ao consumo humano e animal. As abordagens comumente utilizadas na indústria de ração baseiam-se na inclusão de adsorventes orgânicos ou inorgânicos em alimentos, buscando remover seletivamente uma

porcentagem das micotoxinas, e, conseqüentemente, reduzir a exposição do trato gastrointestinal à ação dessas substâncias (Bata e Lasztity, 1999; Hazel e Patel, 2004).

Existem inúmeros métodos para a descontaminação dos alimentos. Os mais avaliados são os métodos físicos químicos e biológicos (Huwig et al., 2001; Diaz et al., 2004). Todavia, a maior parte das técnicas não se tornou popular, devido ao alto custo ou dificuldades práticas envolvidas no processo de detoxificação.

Métodos químicos têm sido desenvolvidos e analisados quanto ao potencial de reduzir os índices de contaminação nos alimentos, sendo que algumas micotoxinas podem ser destruídas por hidróxido de cálcio e amônia (Park, 1993). Particularmente, a amonização é um procedimento aprovado para a descontaminação de rações com aflatoxina em alguns estados dos EUA e na França. O inconveniente é que esse tipo de detoxificação química é ineficaz para outras micotoxinas, e pode inclusive causar deterioração na ração dos animais e por em risco a saúde humana e animal, devido ao excesso de resíduo de amônia na alimentação (Huwig et al., 2001).

Os adsorventes físicos têm sido extensivamente estudados e disponibilizados como preparações comerciais para ração animal, contudo, muitos deles apresentam baixa eficiência na desintoxicação de micotoxinas (Huwig et al., 2001).

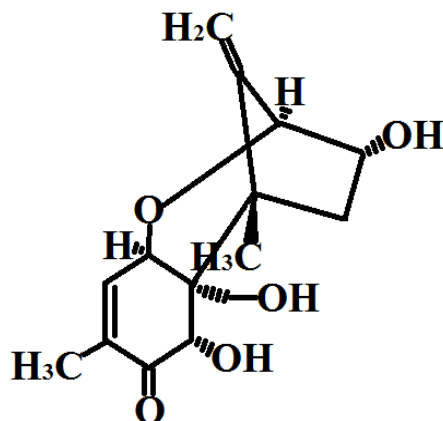
Os métodos biológicos têm se destacado em relação aos demais, uma vez que permitem a redução da concentração de micotoxinas ainda no campo, por meio de bactérias que promovem a degradação natural de tricotecenos (Miller e Atkinson, 1986; Franco et al., 2011). A capacidade do *Lactobacillus* spp. em inibir o crescimento do *Fusarium graminearum* e reduzir os índices de DON *in vitro* foi comprovada (Franco et al., 2011).

Após a colheita, o efeito descontaminante de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* e de bactérias ácido-lácticas já se encontra estabelecido e amplamente utilizado na gestão e preservação de rações e alimentos. Além destes, destacam-se outros gêneros bacterianos e fúngicos, tais como *Flavobacterium* spp., *Nurospora* spp., *Rhizopus* spp., *Mucor* spp., que têm demonstrado boa capacidade de degradar enzimaticamente algumas micotoxinas (Ciegler et al., 1966; Bata e Lasztity, 1999).

Os principais derivados de DON correspondem a metabólitos formados por ação de fungos (derivados acetilados: 3- e 15-acetil-DON ou 3ADON e 15ADON), por plantas (3-O-glucosídeo ou D3G-DON), animais (derivados do ácido glucurônico: DON-3 e DON-15-glucuronido ou D3GA e D15GA) ou por bactérias, cujo metabólito é DOM-1 (de-epoxi-desoxinivalenol) (Maresca, 2013).

A metabolização de DON promove alterações importantes na polaridade da molécula. O metabólito DOM-1 (Figura 2.2), não apresenta o oxigênio ligado ao grupo epóxi, esta característica conseqüentemente acarreta redução na capacidade de penetração celular e, por conseguinte minimiza as interferências sobre a síntese proteica (Maresca, 2013).

**Figura 2.2** Estrutura química do de-epoxi-desoxinivalenol (DOM-1).



Fonte: Maresca (2013).

A avaliação da toxicidade de DOM-1 em cultivo celular (sete e 24 horas) a partir de linfócitos mostrou que o metabólito não apresentou potencial indutor de apoptose e necrose em doses de cinco e 10  $\mu\text{M}$ . O contrário foi observado quanto ao DON testado nas mesmas condições, em que se evidenciou o aumento do índice apoptótico e necrose (Nasri et al., 2006).

Podemos concluir que a capacidade do DON em proporcionar alterações ao organismo foi comprovada em modelos animais, uma vez que há grande similaridade entre as funções fisiológicas desses com o ser humano. Em face à crescente necessidade de regulamentações mais rígidas quanto aos níveis de DON, é necessário o estabelecimento de medidas preventivas desde o campo até o momento da ingestão do alimento, que sabidamente pode estar contaminado. Dentre as tecnologias capazes de reduzir os índices de contaminação, a metabolização bacteriana favorece a conversão do DON no metabólito DOM-1, que demonstra em poucos estudos realizados até o momento menor toxicidade celular, podendo ser uma alternativa viável e econômica, com baixo risco à saúde humana e animal.

## REFERÊNCIAS

- ARNOLD, D. L. et al. The toxicity of orally administered deoxynivalenol (vomitoxin) in rats and mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 9, p. 935-941, 1986.
- BATA, A.; LASZTITY, R. Detoxification of mycotoxin contaminated food and feed by microorganisms. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 223–228, 1999.
- BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell derived innate immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 199-209, 2005.
- BRACARENSE, A. P. F. L. et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition** v. 107, p. 1776–1786, 2012.
- CHOI, B.-K. et al. Effects of oral deoxynivalenol exposure on immune-related parameters in lymphoid organs and serum of mice vaccinated with porcine parvovirus vaccine. **Mycotoxin Research**, v. 29, p. 185–192, 2013.
- CIEGLER, A. et al. Microbial detoxification of aflatoxin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 14, p. 934–939, 1966.
- DIAZ, D. E. et al. Aflatoxin adsorbents II: Reduction of aflatoxin M1 in milk by sequestering agents of cows consuming aflatoxin in feed. **Mycopathologia**, v. 157, p. 233–241, 2004.
- EHRlich, K. C.; DAIGE, K. W. Protein synthesis by mammalian cells treated with C-3 modified analogs of the 12,13-epoxytricothecenes T-2 and T-2 tetraol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 914-918, 1985.
- ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185–206, 2015.
- FEINBERG, B.; MCLAUGHLIN, C. S. Biochemical mechanism of action of tricothecene mycotoxins. In: VR, B. (Ed.). **Tricothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects**. Florida: CRC Press, Boca Raton, v.1, 1989. cap. 1, p.27-35.
- FORSELL, J. H. et al. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3FI mouse **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, n. 2, p. 155-162, 1987.
- FRANCO, T. S. et al. Lactic acid bacteria in the inhibition of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol detoxification. **Journal of Applied Microbiology**, p. 1-10, 2011.
- GEREZ, J. R. et al. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, p. 89–98, 2015.
- GOUZE, M. E. et al. Effect of various doses of deoxynivalenol on liver xenobiotic metabolizing enzymes in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 476–483, 2006.

GOYARTS, T. et al. Effect of the Fusarium toxin deoxynivalenol (DON) on IgA, IgM and IgG concentrations and proliferation of porcine blood lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 858–867, 2006.

GUILLOTEAU, P. et al. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 4–22, 2010.

HAZEL, C. M.; PATEL, S. Influence of processing on trichothecene levels. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 51–59, 2004.

HUWIG, A. et al. Mycotoxin detoxication of animal feed by different adsorbents. **Toxicology Letters**, v. 122, p. 170-188, 2001.

KOLF-CLAUW, M. et al. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1580–1584, 2009.

KUSHIRO, M. Effects of Milling and Cooking Processes on the Deoxynivalenol Content in Wheat. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 2127-2145, 2008.

LOWELL, C. A. SCR-family kinases: Rheostats of immune cell signaling. **Molecular Immunology**, v. 41, p. 631-643, 2004.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. **Mycotoxin and mycotoxicosis in swine**. Santa Maria: LAMIC, 2011.

MARESCA, M. From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. **Toxins**, v. 5, p. 784-820, 2013.

MARESCA, M.; FANTINI, J. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. **Toxicon**, v. 56, p. 282–294, 2010.

MILLER, J. D.; YOUNG, J. C.; TRENHOLM, H. L. Fusarium toxins in field corn. I. Time course of fungal growth and production of deoxynivalenol and other mycotoxins. **Canadian Journal Botany**, v. 61, p. 3080–3087, 1983.

MILLER, K.; ATKINSON, H. A. C. The in vitro effects of trichothecenes on the immune system. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6/7, p. 545-549, 1986.

MINAMI, L. et al. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 3, p. 207-224, 2004.

NASRI, T. et al. Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 20 p. 832–840, 2006.

PARK, D. L. Controlling aflatoxin in food and feed. **Food Technology**, v. 47, n. 10, p. 92-96, 1993.

PESTKA, J. J.; ISLAM, Z.; AMUZIE, C. J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. **Toxicology Letters**, v. 178, p. 83–87, 2008.

PESTKA, J. J.; LIN, W. S.; MILLER, E. R. Emetic activity of trichothecenes 15-acetyldeoxynivalenol in pigs. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, p. 855-858, 1987.

PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 8, p. 39–69, 2005.

PESTKA, J. J. et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 61–73, 2004.

PINTON, P. et al. Deoxynivalenol Impairs Porcine Intestinal Barrier Function and Decreases the Protein Expression of Claudin-4 through a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 1956–1962, 2010.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. **British Medical Bulletin**, v. 56, p. 184-192, 2000.

PLACINTA, C. M.; D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. **Animal Feed Science Technology**, v. 78, p. 21-37, 1999.

RANDALL, K.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: A review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, v. 27, p. 267–284, 2011.

RILEY, R. T. et al. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Research Triangle Park**, v. 109, p. 301-308, 2001.

RIZZO, A. F. et al. Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 41, p. 81-90, 1998.

ROBBANA-BARNAT, S. et al. Immunosuppressive Properties of Deoxynivalenol. **Toxicology**, v. 48, p. 155-166, 1988.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed **Toxins**, v. 4, p. 663-675, 2012.

SAHU, S. C.; JR, M. W. O. D.; WIESENFELD, P. L. Comparative hepatotoxicity of deoxynivalenol in rat, mouse and human liver cells in culture. **Journal Applied Toxicology**, v. 30, p. 566–573, 2010.

SANTIN, E. et al. Micotoxinas do Fusarium spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v. 31, p. 185-190, 2000.

SANTOS, J. S. et al. Monitoramento e nível de ingestão de desoxinivalenol por trigo. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 4, p. 1439-1450, 2011.

SANTÚRIO, J. M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, p. 1-12, 2000.

SERGEANT, T. et al. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. **Toxicology Letters**, v. 164, p. 167–176, 2006.

SWINDLE, M. M.; SMITH, A. C. Comparative and physiology of the pig. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**, v. 25, p. 11-21, 1998.

World Health Organization - WHO. Deoxynivalenol. In: 906, W. T. R. S. (Ed.). **Evaluation of Certain Mycotoxins in Food**. Geneva: World Health Organization, 2002. p.35–42.

WILLIAMS, J. H. et al. Human aflatoxicosis in developing countries: A review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 80, p. 1106–1122, 2004.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

- Determinar os efeitos tóxicos de desoxinivalenol (DON) em diferentes doses e tempos de intoxicação, sobre o fígado, baço e linfonodos mesentéricos de ratos e comparar o efeito tóxico do metabólito de-epoxi-desoxinivalenol (DOM-1) em relação à molécula nativa sobre o fígado, baço, linfonodos mesentéricos e intestino de suínos.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar as alterações microscópicas e imunohistoquímicas após diferentes tempos e doses de intoxicação por DON no fígado, baço e linfonodos mesentéricos de ratos.

- Detectar e comparar as alterações microscópicas e imunohistoquímicas quanto á proliferação celular e apoptose após diferentes tempos e doses de intoxicação por DON e DOM-1 no fígado, baço, linfonodos mesentéricos e intestino de suínos.



#### 4. SYSTEMIC EFFECTS OF DEOXYNIVALENOL IN RATS AT DIFFERENT DOSES AND EXPOSURE TIME

##### Abstract

Deoxynivalenol (DON) is one of the most important mycotoxins present in food, inducing adverse effects, including neuroendocrine changes and immunosuppression. The aim of the present study was to investigate the effects of DON in rats exposed to acute, subacute and chronic mycotoxin-contaminated diets, through histological and immunohistochemical analysis on liver and lymphoid organs. Fifty rats were divided into five groups receiving a control diet, a diet with 2 mg kg<sup>-1</sup> or 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON. The experimental period was 30 days for the group receiving the lowest dose and 7, 14 and 30 days for the groups fed 10 mg kg<sup>-1</sup>. The main findings observed were hepatocyte vacuolation, megalocytosis and lymphoid depletion. A significant increase in the lesional score was observed in all contaminated groups. The changes were more severe on rats fed 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON during 30 days. A significant increase on hepatocyte proliferation was observed in rats receiving 2 mg kg<sup>-1</sup> of DON. A significant increase on lymphocyte apoptosis was observed on mesenteric lymph nodes in all groups. Results of morphological and immunohistochemical analysis indicated that ingestion of DON can induce liver functional impairment and immunosuppression in a dose-dependent manner. These results reinforce that the effects of DON on tissue morphology and function may predispose animals to other environmental factors due to failures in the immune response.

**Keywords:** Mycotoxin, cell proliferation, immunosuppression.

##### 4.1. INTRODUCTION

Mycotoxins, secondary metabolites of fungi, commonly contaminate food and feed. Deoxynivalenol (DON) is one of the most important and frequent mycotoxin of the tricothecenes group (Escrivá et al., 2015). Contamination levels of grains and cereals with DON worldwide range between 0.256 to 49.307 mg kg<sup>-1</sup> (Rodrigues and Naehrer, 2012).

DON has been associated with a spectrum of adverse effects that include anorexia, growth suppression, emesis, nausea, neuroendocrine changes, and immunosuppression (Pestka, 2010). Surprisingly, there are few studies focusing the effects of DON on histological parameters on rats (Abdel-Wahhab et al., 2015; Wang et al., 2014). Rats fed contaminated diets (0.25 to 20 mg kg<sup>-1</sup>) of DON during 63 to 90 days showed no significant tissue lesions or changes on liver detoxification systems (Morrissey et al., 1985; Arnold et al., 1986a). On the other hand, mice submitted to high

doses of DON (78 to 100 mg kg<sup>-1</sup>) in the diet showed extensive necrosis of the gastrointestinal tract, bone marrow and lymphoid tissues, and focal lesions in kidney and cardiac tissue (Forsell et al., 1987). Moreover, mice fed contaminated diets with increasing doses (10, 20 and 50 mg kg<sup>-1</sup>) of DON showed decreased weight of thymus and spleen due to atrophy of lymphoid follicles (Robbana-Barnat et al., 1988).

Histological changes on lymphoid tissues are assigned to DON-induced apoptosis contributing to immunosuppression (Mikami et al., 2010; Zhou et al., 2000). This apoptosis signaling pathway may occur by modulating the expression of TNF- $\alpha$  and caspase-3 activation (Mikami et al., 2010; Pestka et al., 2008; Zhou et al., 2000). The deleterious mechanism caused by DON is the activation of the MAPK pathway, also called “ribotoxic stress response” (Pestka et al., 2008). This mechanism affects cytoskeleton organization, lymphocyte activation and contribute to immune dysregulation (Pan et al., 2013).

Considering that DON affects cells with high turnover, both *in vitro* and *in vivo* studies focused mainly the effects of DON on lymphoid cells or lymphoid tissues (Forsell et al., 1987; Choi et al., 2013). In *in vitro* studies DON inhibited human and rat granulo-monocytic progenitors in a concentration-dependent manner (Lautraite et al., 1997), as well as in blood cell lines (Baltriukiene et al., 2007). Data about the toxic effects of DON on tissues with low turnover, such as liver, are conflicting. Liver cell lines from different species (rat, mouse and human) exposed to increasing concentrations of DON showed a dose-dependent hepatotoxicity and different species sensitivity (Sahu et al., 2010). Moreover, DON hepatotoxicity was related to an increase in oxidative stress and a decrease in mitochondrial function (Sahu et al., 2008).

Toxicological differences between species were well known. Laboratory animals are relatively resistant to mycotoxins (Forsell et al., 1986). For this reason, high acute doses of mycotoxins are frequently used in *in vivo* studies with murine models (Morrisey et al., 1985; Zhou et al., 2000). However, natural contamination of feed and food presents mainly low doses and animals are exposed in a chronic way (Zain et al., 2011). We are interested in investigating the effects of low doses of DON in rats exposed to acute, subacute and chronic contaminated diets. We also aimed to evaluate the effects in stable (hepatocytes) and labile (lymphocytes) cells in an *in vivo* model. To accomplish these objectives we used histological and immunohistochemical assays on liver and lymphoid organs of rats.

## 4.2. MATERIAL AND METHODS

### 4.2.1. Animals and Experimental Design

Fifty rats, Wistar, 56 days-old were used in this study. Animals were distributed in five groups, housed in plastic cages at 22°C with periods of 12 hours of dark-light.

Animals had free access to water and food. All animal experiments were performed at Toxalim animal facility (INRA, UMR 1331, Toulouse), licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement n°B31.555.13). All animal experiments complied with the European Union regulation, reviewed by the regional ethics committee (CNREEA n°1; MP/03/62/11/11).

Purified DON was purchased from Sigma (Saint-Quentin Fallavier, France). Purified DON was included in animals' diet. Control and contaminated diet were manufactured at the INRA UPAGE (Unité de préparation des aliments, Jouy-en-Josas, France) and formulated according to requirements for rats. Animals that received only food; control group (Group I). Doses of DON used were 2 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> of food during 30 days (Group II) and 10 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> of food during 7 days (Group III), 14 days (Group IV) and 30 days (Group V).

Processing and histopathological and immunohistochemical reading was held at the Pathology Laboratory of the State University of Londrina.

### 4.2.2. Histopathological and Immunohistochemical Assays

At the end of the experimental period, rats were euthanized by cervical dislocation. Samples of mesenteric lymph nodes, spleen and liver were fixed in 10% buffered formalin. Tissue pieces were dehydrated through graded alcohols and embedded in paraffin. Sections of 5 µm were stained with hematoxylin-eosin for histological evaluation. A lesional score was designed to compare histological changes. The frequency and severity of each criterion were considered in the score, 0 (absent), 1 (discrete), 2 (moderate) and 3 (severe). For spleen and lymph nodes the following criteria were included in the score: lymphoid depletion of follicular area, necrosis of lymphoid follicles, medullary histiocytosis, eosinophilic infiltrate, number of mitotic figures and apoptotic corpuscles. The severity factor considered to necrosis was 3; to

lymphoid depletion was 2 and to other criteria was 1. The mitotic figures and apoptotic corpuscles were counted in five random fields (400x magnification) considering the following score: 1 (0 to 5 mitotic figures or apoptotic bodies/field), 2 (6 to 10) and 3 (> 10) (Gerez et al., 2015).

For analysis of the liver the evaluated criteria were trabecular disorganization, mononuclear cell infiltration, cytoplasmic vacuolar degeneration, nuclear vacuolar degeneration, megalocytosis, apoptosis and necrosis. The severity factor was considered 1 to trabecular disorganization, mononuclear cell infiltration, cytoplasmic vacuolar degeneration and nuclear vacuolar degeneration. To megalocytosis the severity factor was 2 and necrosis was 3.

Apoptosis was evaluated by an immunohistochemical assay using anti-caspase-3 (CCasp3) (anti-Asp 175, 1:200 dilution, Cell Signaling Technology, Beverly, MA) and cell proliferation by anti-PCNA (Clone PC10, 1:200 dilution, Zymed).

The immunohistochemical procedures were described previously (Bracarense et al., 2012). The immunoexpression of CCasp3 in the liver, lymph nodes and spleen was estimated by counting positive immunostaining of cell cytoplasm in five fields at 400x magnification. The immunoexpression of PCNA in the liver was estimated by counting strongly positive immunostained nucleus in five fields at 400x magnification.

#### 4.2.3. Statistical Analysis

The values of scores are presented as means  $\pm$  SEM. The scores were statistically analyzed using normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity (Bartlett) tests. When these two assumptions were verified, the analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by Tukey's test. The alpha level was set at 0.05.

### 4.3 RESULTS

#### 4.3.1 Effects of DON on Liver

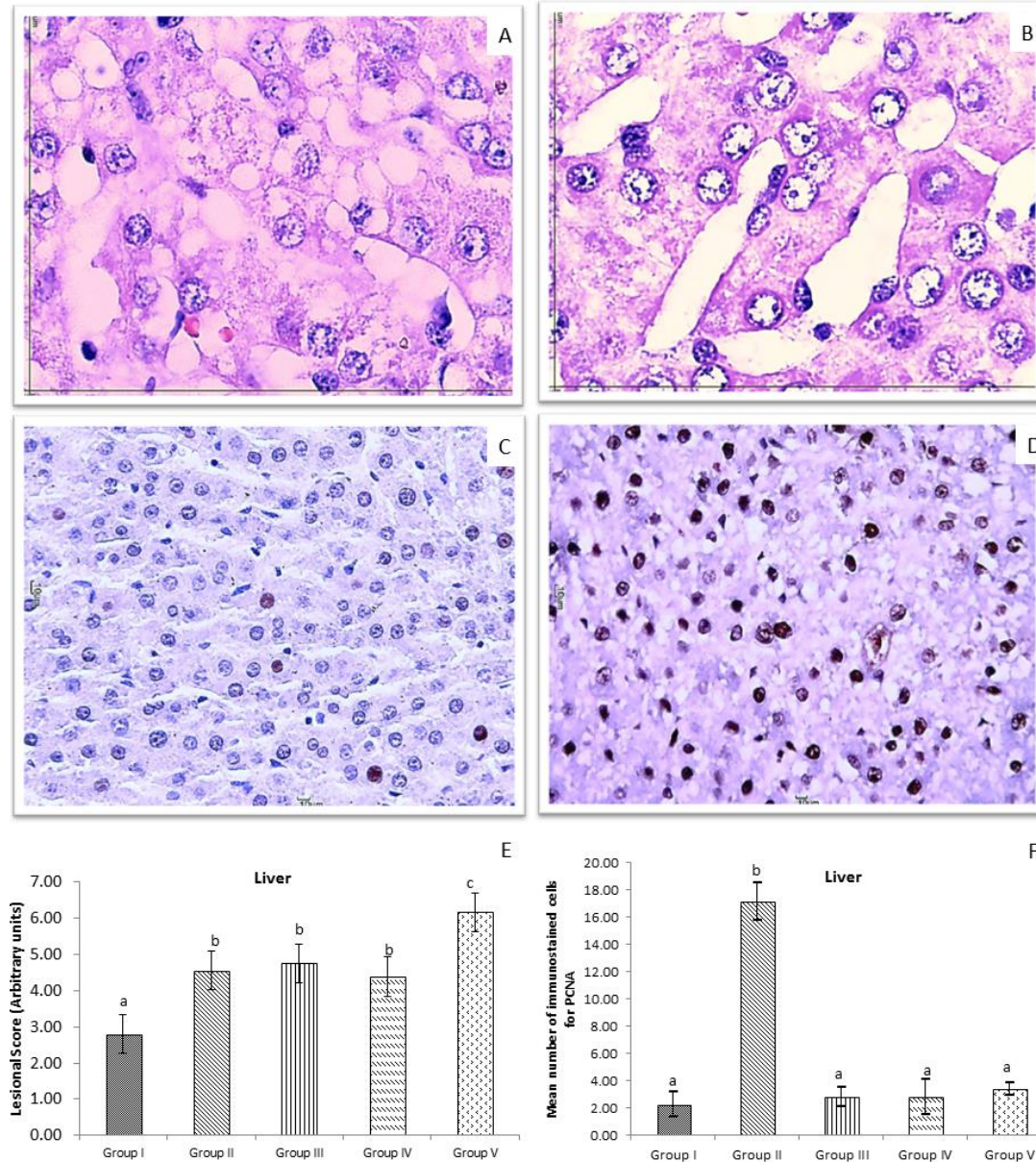
The main histological findings observed on the liver of rats fed 2 mg kg<sup>-1</sup> for 30 days of DON were mild trabecular disorganization, moderate hepatocyte

vacuolation and inflammatory infiltrate. The groups receiving  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of DON for 7 and 14 days showed similar changes plus mild hepatocyte megalocytosis. Rats fed the higher dose ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of DON for 30 days showed the greatest lesional score, characterized by the lesions observed in the others groups accompanied by nuclear vacuolation (Figure 4.1A and B).

Ingestion of all contaminated diets induced a significant increase on lesional score compared to control (Figure 4.1E). Moreover, a significant increase on liver lesions was observed after the ingestion of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of DON for 30 days when compared to groups fed the same dose for lower periods (7 and 14 days) and with group fed with  $2 \text{ mg kg}^{-1}$ .

A significant increase in cell proliferation was observed in the liver of rats fed  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  DON diet ( $17.16$  immunostained cells/field, Figure 4.1D) when compared to control ( $2.25$  immunostained cells/field). The ingestion of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of DON showed no significant difference in hepatocyte proliferation compared to control (Figure 4.1F). For caspase-3, no immunostaining was observed in the liver of experimental animals.

**Figure 4.1.** Effects of DON on the liver of rats submitted to different treatments with DON. Group I: control; Group II: 2 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 30 days; Group III: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 7 days; Group IV: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 14 days; Group V 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON during for 30 days. (A) Disorganization of hepatic cords and cytoplasmatic vacuolation (group V) (H.E., 40X); (B) Megalocytosis and nuclear degeneration (group V). (H.E., 40X); (C) Mild immunostaining for PCNA in the liver of rats exposed to DON (group III); (D) Strong and diffuse immunostaining for PCNA in the liver of rats exposed to DON (group II). (E) Mean lesional scores on liver. (F) Mean number of immunostained cells for PCNA3 in liver. Different letters show significant differences by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

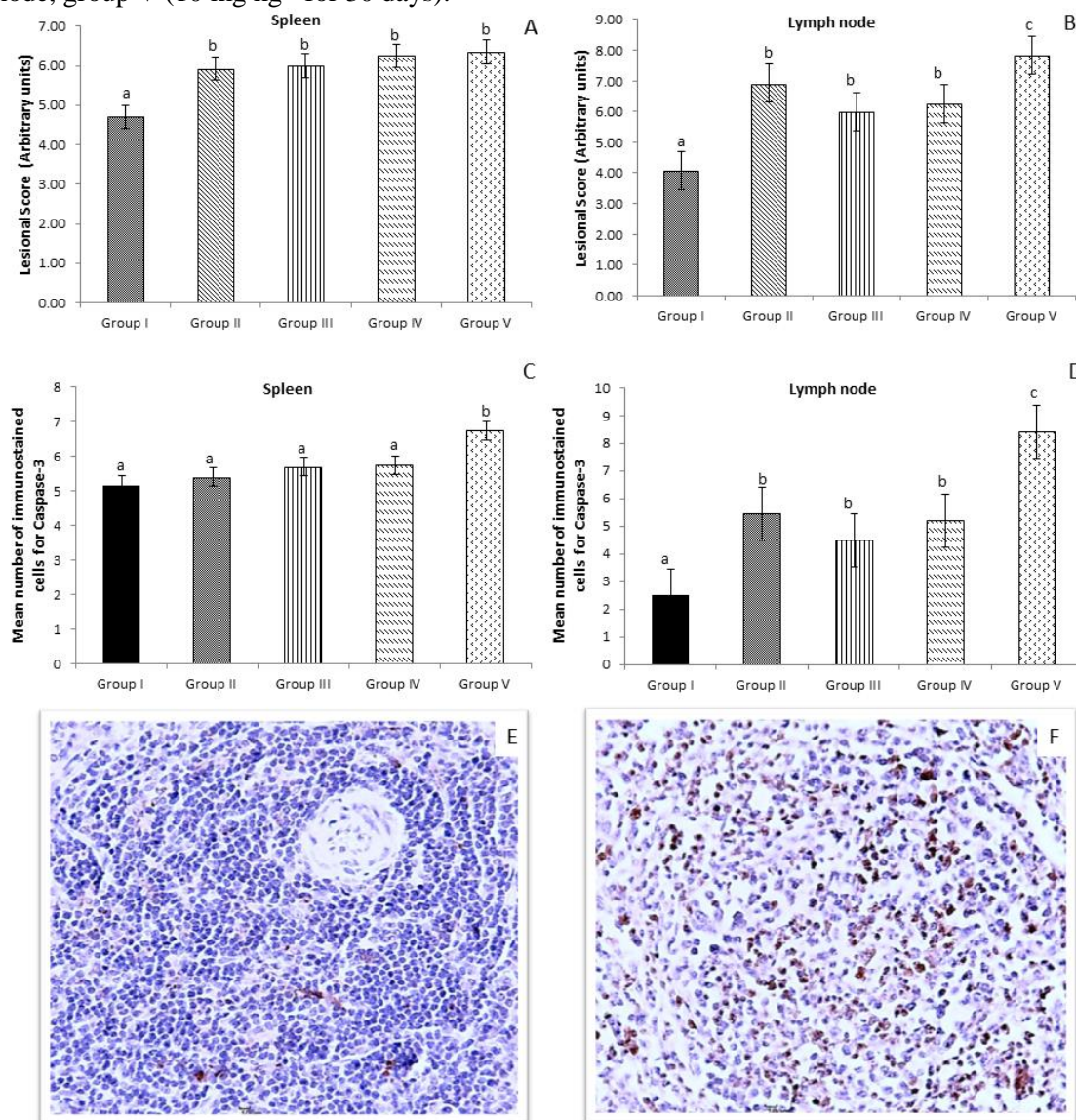


#### 4.3.2. Effects of DON on Lymphoid Organs

The main histological findings on lymphoid organs of rats fed the contaminated diets were lymphoid depletion and lymphocyte apoptosis. A significant increase of the lesional score on spleen and lymph nodes was observed in all DON-contaminated groups compared to control animals (Figure 4.2A and B). On spleen no significant difference was observed between the contaminated diets (Figure 4.2A), whereas on mesenteric lymph nodes ingestion of  $10 \text{ kg}^{-1}$  of DON for 30 days induced a significant increase in the lesional score compared to other contaminated groups (Figure 4.2B).

The apoptotic index on both lymphoid organs increased in rats receiving DON-contaminated diets (Figure 4.2C and D). The ingestion of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of DON for 30 days induced in spleen and lymph nodes a significant increase in the apoptotic index compared to control and other groups receiving contaminated diets (Figure 4.2E and F).

**Figure 4.2.** Effects of DON on lymphoid organs of rats submitted to different treatments with DON. Group I: control; Group II: 2 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 30 days; Group III: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 7 days; Group IV: 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON for 14 days; Group V 10 mg kg<sup>-1</sup> of DON during for 30 days. (A) Mean lesional scores on spleen and (B) mesenteric lymph nodes. (C) Mean number of immunostained cells for caspase-3 in spleen and (D) lymph nodes. Different letters show significant differences by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). (E) Mild immunostaining for caspase-3 in the spleen, group II (2 mg kg<sup>-1</sup> for 30 days) (F) Diffuse immunostaining for caspase-3 in the lymph node, group V (10 mg kg<sup>-1</sup> for 30 days).



#### 4.4. DISCUSSION

Trichothecene toxicity differs among species. Pigs were considered one of the most sensible species whereas rodents were relatively resistant (Pestka 2007). Despite this characteristic, laboratory animals continue to be the main species used in mycotoxins experimental procedures (Islam et al., 2003; Pestka et al., 2008; Escriva et al., 2015; Gerez et al., 2015). Data about DON hepatotoxicity and immunotoxicity in rats

and mice are controversial. The present study aimed to investigate the effects of DON in rats submitted to an acute, sub-acute and chronic ingestion of low ( $2 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and high doses ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ). In previous studies, rats chronically fed with diets containing 0.25, 0.5, 1 mg and  $6.25 \text{ mg kg}^{-1}$  of DON showed no lesions in liver, kidney and lymphoid organs (Arnold et al., 1986a,b). Similar results were reported in mice fed chronically with low and high doses of DON ( $0.5$  until  $100 \text{ mg kg}^{-1}$ ) (Forsell et al., 1986, Robbana-Barnat et al., 1988).

In this study, DON-hepatotoxicity was verified in all groups independently of the dose and time of exposition. Moreover, the higher dose ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) of DON combined with the longer period of exposition (30 days) induced a significant increase in histological lesions on liver compared to other contaminated groups. Hepatocyte necrosis was reported in rats exposed to a single intra-peritoneal dose of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of DON 3 hours after inoculation (Sahu et al., 2008). Liver injury indicated by increased liver function enzymes, lipid peroxidation and decreased hepatic glutathione content was also reported in rats fed DON-contaminated diets ( $5 \text{ mg kg/body weight}$ ) for 21 days. Furthermore, increased expression of tumor necrosis factor  $\alpha$ , DNA fragmentation, up regulating mRNA Fas and TNF- $\alpha$  gene were associated to cytotoxicity (Abdel-Wahhab et al., 2015). In mice, an increase in hepatic enzymes and a decrease in albumin and/or total protein in the serum was associated with an upregulation of the apoptotic genes caspase-3 and Bax (Sun et al., 2014). In *in vitro* studies using hepatocytes cultures cytotoxicity was reported in a dose-dependent manner (Bradlaw et al., 1985; Rizzo et al., 1994, Taranu et al., 2010). The toxicity was related to an increase in oxidative stress and a decrease in protein and DNA synthesis (Sahu et al., 2008, Doll et al., 2009) that can result in cell death. In addition, rat liver cells BRL 3A treated with DON ( $60 \mu\text{M}$ ) for 12, 24 and 48 hours showed increased production of oxygen reactive species resulting in cell apoptosis. The effect was modulated by increased expression of stress and apoptotic genes (Sun et al., 2015). In the present study, no hepatocyte apoptosis was observed. This difference is probably related to the different methods (*in vitro* and *in vivo*) and also the doses used. Apparently, the doses used in this study were not sufficient to induce hepatocyte apoptosis.

Cell proliferation index was significantly increased in rats fed  $2 \text{ mg kg}^{-1}$  for 30 days (7.16 folder increases) compared to control group. In a previous study we observed in pigs fed DON-contaminated diets ( $3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a significant increase in

hepatocyte proliferation. However, *in vitro* studies reported anti-proliferative properties in intestinal cells exposed to DON (10  $\mu\text{M}$ ) (Bianco et al., 2012). It is interesting to note that only the lowest dose induced a significant increase. Probably this difference is related to the dose. The actual hypothesis associates the type of MAP kinases activation with the doses of DON used. Low doses activate ERK leading to cell survival and gene expression, while high doses activate p38 leading to protein synthesis inhibition (Maresca, 2013). The results of the present study reinforce this hypothesis since higher doses, independently of the period of exposure, showed no effect on cell proliferation.

Modulation of the immune system by exposition to DON is reported in different species and experimental models (Mikami et al., 2010; Choi et al., 2013). In the present study, an increase in the lesional score was observed both in the spleen and lymph nodes in all contaminated groups. The main histological change was lymphoid depletion that was also reported in the thymus of rats fed a diet containing 5  $\text{mg kg}^{-1}$  for 28 days (Sprando et al., 2005). In addition, thymidine labeling was decreased in the spleen of rats fed a diet with 1  $\text{mg kg}^{-1}$  of DON (Arnold et al., 1986a). DON also induced a reduction in rat and human peripheral blood lymphocytes (PBL) exposed to 90  $\text{ng/ml}^{-1}$  and 220  $\text{ng/ml}$  of the mycotoxin (Atkinson et al., 1984). In pigs chronically exposed to DON (1.5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) we have showed that lymphoid depletion was related to an increase in lymphocyte apoptosis (Gerez et al., 2015). However, to best of authors' knowledge data about DON-induced apoptosis in rats are limited to *in vitro* studies (Bianco et al., 2012; Sun et al., 2015).

In this study a significant increase in lymphocyte apoptosis was observed in the mesenteric lymph nodes in all contaminated groups, whereas in the spleen this increase occurred only in rats receiving the higher dose for 30 days. This difference is explained as a variance in the response of immune cells to DON toxicity (Zhou et al., 1998, Islam et al., 2003). In *in vitro* study, Baltriukiene et al. (2007) reported that the DON effect was cell origin-dependent and dose-dependent, mainly affecting blood cell lines, whereas hepatocytes were less sensitive to DON. We can also consider that mesenteric lymph nodes that are responsible for drainage of intestine (the first exposed system to xenobiotics) are more exposed to mycotoxin effects than the spleen. A pro-apoptotic way is proposed for DON-induced apoptosis i) Bax induction; (ii) Bcl-2 inhibition, and (iii) caspase-3 activation as a result of increased reactive oxygen species (Bianco et al., 2012; Sun et al., 2015). Our results also showed that in lymphoid tissues DON induce an increase in the expression of caspase-3. Taken

together, the results of the present study indicate that the immune system is a primary target for caspase-3 activation. Additionally, we showed that DON is hepatotoxic in rats; however the mechanism of hepatocyte lesion requires further investigation.

#### REFERENCES

- ABDEL-WAHHAB M. A. et al. Effectiveness of activated carbon and egyptian montmorillonite in the protection against deoxynivalenol-induced cytotoxicity and genotoxicity in rats. **Food Chem Toxicol**, v. 83, p. 174-82, 2015.
- ARNOLD, D. L. et al. A short-term feeding study with deoxynivalenol (Vomitoxin) using rats. **Fund appl toxicol**, v. 6, p. 691-96, 1986a.
- ARNOLD, D. L. et al. The toxicity of orally administered deoxynivalenol (vomitoxin) in rats and mice. **Food Chem Toxicol**, v. 24, n. 9, p. 935-41, 1986b.
- ATKINSON, H. A.; MILLER, K. Inhibitory effect of deoxynivalenol, 3-acetyldeoxynivalenol and zearalenone on induction of rat and human lymphocyte proliferation. **Toxicol Lett**, v. 23, n. 2, p. 215-21, 1984.
- BALTRIUKIENE, D.; KALVELYTE, A.; BUKELSKIENE, V. Induction of apoptosis and activation of JNK and p38 MAPK pathways in deoxynivalenol-treated cell lines. **Altern Lab Anim**, v. 35, n. 1, p. 53-9, 2007.
- BIANCO, G. et al. Nivalenol and deoxynivalenol affect rat intestinal epithelial cells: a concentration related study. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52051, 2012.
- BRADLAW, J. A. et al. Evaluation of purified 4-deoxynivalenol (vomitoxin) for unscheduled DNA synthesis in the primary rat hepatocyte-DNA repair assay. **Food Chem Toxicol**, v. 23, n. 12, p. 1063-7, 1985.
- CHOI, B. K. et al. Effects of oral deoxynivalenol exposure on immune-related parameters in lymphoid organs and serum of mice vaccinated with porcine parvovirus vaccine. **Mycotoxin Res**, v. 29, n. 3, p. 185-92, 2013.
- DOLL, S. et al. Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytotoxicity protein synthesis and metabolism of DON in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. **Toxicol. Lett**, v. 189, p. 121–129, 2009.
- ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. **Food Chem Toxicol**, v. 78, p. 185-206, 2015.
- FORSELL, J. H. et al. Comparison of acute toxicities of deoxynivalenol (vomitoxin) and 15-acetyldeoxynivalenol in the B6C3FI mouse. **Food Chem Toxicol**, v. 25, n. 2, p. 155-62, 1987.

- FORSELL, J. H.; WITT, M. F.; TAI, J-H. Effects of 8-week exposure of the b6c3f1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food Chem Toxicol**, v. 24, n. 3, p. 213-19, 1986.
- GEREZ, J. R. et al. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. **Exp Toxicol Pathol**, v. 67, p. 89-98, 2015.
- LAUTRAITE, S. et al. In vitro toxicity by deoxynivalenol (DON) on human and rat granulomonocytic progenitors. **Cell Biol Toxicol**, v. 13, n. 3, p. 175-83, 1997.
- ISLAM, Z. et al. Differential induction of glucocorticoid-dependent apoptosis in murine lymphoid subpopulations in vivo following coexposure to lipopolysaccharide and vomitoxin (deoxynivalenol). **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 187, n. 2, p. 69-79, 2003.
- MARESCA, M. From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. **Toxins**, v. 5, p. 784-820, 2013.
- MIKAMI, O. et al. Induction of apoptotic lesions in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets. **J Vet Sci**, v. 11, n. 2, p. 107-13, 2010.
- MORRISSEY, R. E.; NORRED, W. P.; VESONDER, R. F. Subchronic toxicity of vomitoxin in sprague-dawley rats. **Food Chem Toxicol**, v. 23, n. 11, p. 995-99, 1985.
- PAN, X. et al. Early phosphoproteomic changes in the mouse spleen during deoxynivalenol-induced ribotoxic stress. **Toxicol Sci**, v. 135, n. 1, p. 129-43, 2013.
- PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. **Animal Feed Sci Technol**, v. 137, p. 283–298, 2007.
- PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Arch Toxicol**, v. 84, p. 663-79, 2010.
- PESTKA, J. J.; ISLAM, Z.; AMUZIE, C. J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. **Toxicol Lett**, v. 178, p. 83-7, 2008.
- RIZZO, A. F. et al. Protective effect of antioxidants against free radical mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. **Zentralbl Veterinarmed A**, v. 41, n. 2, p. 81-90, 1994.
- ROBBANA-BARNAT, S. et al. Immunosuppressive properties of deoxynivalenol. **Toxicol**, v. 48, n. 2, p. 155-66, 1988.
- RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A Three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, p. 663-75, 2012.
- SAHU, S. C. et al. Rat liver clone-9 cells in culture as a model for screening hepatotoxic potential of food-related products: hepatotoxicity of deoxynivalenol. **J Appl Toxicol**, v. 28, p. 765-72, 2008.

SAHU, S. C. et al. Comparative hepatotoxicity of deoxynivalenol in rat, mouse and human liver cells in culture. **J Appl Toxicol**, v. 30, p. 566-73, 2010.

SPRANDO, R. L. et al. Characterization of the effect of deoxynivalenol on selected male reproductive endpoints. **Food Chem Toxicol**, v. 43, n. 4, p. 623-35, 2005.

SUN, L. H. et al. Hepatotoxic effects of mycotoxin combinations in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 74, p. 289-93, 2014.

SUN, L. H. et al. Individual and combined cytotoxic effects of aflatoxin B1, zearalenone, deoxynivalenol and fumonisin B1 on BRL 3A rat liver cells. **Toxicol**, v. 95, p. 6-12, 2015.

TARANU, I. et al. Comparative aspects of in vitro proliferation of human and porcine lymphocytes exposed to mycotoxins. **Arch Anim Nutr**, v. 64, n. 5, p. 383-93, 2010.

WANG, Y. et al. Inhibitory effects of deoxynivalenol on gastric secretion in rats. **J Food Prot**, v. 77, n. 8, p. 1367-71, 2014.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **J Saudi Chem Soc**, v. 15, p. 129-44, 2011.

ZHOU, H. R. et al. Lipopolysaccharide and the trichothecene vomitoxin (Deoxynivalenol) synergistically induce apoptosis in murine lymphoid organs. **Toxicol Sci**, v. 53, p. 253-63, 2000.

ZHOU, H. R.; YAN, D.; PESTKA, J. J. Induction of cytokine gene expression in mice after repeated and subchronic oral exposure to vomitoxin (Deoxynivalenol): differential toxin-induced hyporesponsiveness and recovery. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 151, n. 2, p. 347-58, 1998.

## 5. TOXICIDADE DE DESOXINIVALENOL E DO METABÓLITO DE-EPOXI-DESOXINIVALENOL EM SUÍNOS – ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS.

### TOXICITY OF THE DEOXYNIVALENOL AND METABOLITE DE-EPOXY-DEOXYNIVALENOL IN SWINE – HISTOPATHOLOGICAL AND MORPHOMETRIC ASPECTS

#### Resumo

Desoxinivalenol (DON) é uma das mais importantes e abundantes micotoxinas presentes nos alimentos, com ampla distribuição e altos índices de contaminação nos alimentos. DON, após metabolização bacteriana é transformado em um metabólito denominado De-epoxi-desoxinivalenol (DOM-1) que, supostamente, tem menor toxicidade que a molécula nativa. Assim, a fim de elucidar os efeitos de toxicidade de DON e do metabólito DOM-1, o objetivo do presente estudo foi comparar a toxicidade de DON e de DOM-1 no fígado, baço, linfonodo mesentérico e intestino (jejuno e íleo) de suínos após intoxicação em diferentes tempos e doses. Suínos de 24 dias de vida foram divididos em três grupos que receberam, durante 14 dias, por gavagem (duas vezes ao dia), os seguintes tratamentos: solução tampão (controle); DON ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal); e DOM-1 ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal). Outros três grupos de suínos receberam, durante 28 dias, por gavagem (duas vezes ao dia) os seguintes tratamentos: solução tampão (controle); DON ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal), e DOM-1 ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal). DON ocasionou lesões mais severas ao organismo dos animais em relação ao metabólito DOM-1. A morfologia do fígado, intestino e órgãos linfóides foi comprometida após a ingestão de  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  de DON por 28 dias, enfatizando a toxicidade tempo dependente dessa micotoxina. O metabólito DOM-1 apresentou menor toxicidade ao organismo dos suínos, ocasionando leves alterações histopatológicas no fígado, intestino e nos órgãos linfóides após 14 e 28 dias de intoxicação.

**Palavras chave:** Leitões, micotoxina, tricotecenos.

#### Abstract

Deoxynivalenol (DON) is one of the most important and abundant mycotoxins present in foods, with wide distribution and high contamination levels. After bacterial metabolism, the DON is transformed into a metabolite De-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1), that supposedly has lower toxicity than the native molecule. Thus, the objective was elucidate the effects of toxicity of DON and DOM-1 in liver, spleen, mesenteric lymph nodes and intestine in different times and doses. Swine of 24 days old were divided into three groups that received, for 14 days, by gavage (twice a day), the following treatments: buffer solution (control); DON ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight); and DOM-1 ( $0.3 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight). Another three groups of swine received for 28 days, by gavage (twice a day), the following treatments: buffer solution (control); DON ( $0.15 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight) and DOM-1 ( $0.14 \text{ mg kg}^{-1}$  body weight). DON caused more severe injuries to the animal organism in relation to metabolite DOM-1. The liver, intestine, and lymphoid organs morphology was compromised after ingestion of  $0.15 \text{ mg kg}^{-1}$  DON for 28 days, emphasizing the dependent-time toxicity of this micotoxin. The

metabolite DOM-1 showed lower toxicity to the swine organism, in relation to DON, causing minor histological changes in the spleen, intestine and lymphoid organs after 14 and 28 days of intoxication.

**Key-words:** piglets, mycotoxin, trichothecenes

## 5.1. INTRODUÇÃO

Desoxinivalenol (DON) é uma micotoxina produzida principalmente por fungos do gênero *Fusarium* spp., com ampla distribuição e contaminação em grãos e cereais (Rodrigues e Naehrer, 2012; Lebrun et al., 2015) como arroz, trigo, cevada, milho e soja, com altos níveis de contaminação na América do Norte e Europa (3.226 mg kg<sup>-1</sup> de grãos) e na América do Sul (1.154 mg kg<sup>-1</sup> de grãos) (Rodrigues e Naehrer, 2012).

Para o entendimento dos efeitos tóxicos do DON no organismo humano, muitas vezes são utilizados modelos animais, como ratos e suínos, devido a questões éticas e dificuldade de estudos diretamente em seres humanos (Escrivá et al., 2015). Além disso, a semelhança entre os sistemas biológicos entre as espécies permite a extrapolação dos resultados obtidos em modelos animais para seres humanos (Guilloteau et al., 2010).

Quando administrado por via oral, a primeira fase de intoxicação do DON corresponde à passagem pela parede intestinal, sendo rapidamente absorvido e distribuído no organismo, de modo que o fígado é o primeiro órgão afetado após absorção, seguido do rim, baço, coração e cérebro (Pestka et al., 2008).

Relatos na literatura mostram casos de intoxicação aguda ou crônica, com consequente comprometimento de diversos órgãos em suínos (Grenier et al., 2011). Essa toxicidade é dependente da dose e do tempo de exposição à micotoxina (Gerez et al., 2015).

A toxicidade de DON tem sido atribuída à sua capacidade de ligação ao ribossomo, ocasionando estresse ribotóxico, que leva a ativação da via das MAPkinases, modulação da ativação gênica, inibição da síntese proteica e toxicidade celular (Pestka et al., 2004; Pestka, 2010). A intoxicação crônica com DON (1,5 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal durante 28 dias), em suínos, é responsável pelo aumento no índice apoptótico com consequente depleção dos folículos linfóides nos linfonodos e baço, enquanto que, no fígado é capaz de ocasionar degeneração citoplasmática nos hepatócitos (Gerez et al., 2015). A avaliação do intestino após intoxicação com 3mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal de DON durante cinco semanas, revelou atrofia, fusão das vilosidades intestinais e redução no número de células calciformes (Bracarense et al., 2012).

A toxicidade das micotoxinas tem sido atribuída à combinação de vários fatores como a taxa de penetração celular, o metabolismo por enzimas citosólicas, e a afinidade pelo sítio de ligação celular (Maresca, 2013).

Estudos *in vitro* indicam uma toxicidade reduzida do metabólito de DON, denominado de-epoxi-desoxinivalenol (DOM-1) (Nasri et al., 2006; Maresca, 2013), isto porque o metabólito sofre alterações na conformação da molécula após ação bacteriana, por meio da retirada do oxigênio ligado ao grupo epóxi, o que resulta na redução na polaridade da molécula em comparação com a toxina nativa (Berthiller et al., 2013). A posição e o número dos grupos de hidroxila e acetil-éster podem influenciar na toxicidade da molécula às células eucarióticas (Maresca, 2013).

A comparação da toxicidade de DON e DOM-1 é escassa. Assim, novos estudos que avaliem o grau de lesão ocasionado por DON e seus metabólitos em diferentes órgãos são cruciais para estabelecer os efeitos da toxicidade desse metabólito ao organismo animal e humano (Maresca, 2013).

O objetivo do presente estudo foi comparar as toxicidades de DON e DOM-1 no fígado, baço, linfonodo mesentérico e intestino (jejuno e íleo) de suínos, após intoxicação em diferentes tempos e doses.

## 5.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Animais e Delineamento Experimental

Foram utilizados 36 leitões desmamados de 24 dias de vida (Pietrain/Duroc/Grande-branco), aclimatados durante uma semana no biotério da unidade do ToxAlim INRA (Toulouse, França) antes de serem utilizados nos protocolos experimentais.

Os animais foram divididos em três grupos de seis animais que receberam, durante 14 dias, por gavagem (duas vezes ao dia) uma solução contendo os seguintes tratamentos: solução tampão (controle); desoxinivalenol/DON (0,3 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal); e De-epoxi-desoxinivalenol/DOM-1 (0,3 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal). Outros três grupos receberam, durante 28 dias, por gavagem (duas vezes ao dia), os seguintes tratamentos: solução tampão (grupo controle); desoxinivalenol/DON (0,15 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal), e De-epoxi-desoxinivalenol/DOM-1 (0,14 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal). Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os procedimentos de experimentação em animais foram realizados em conformidade com as diretrizes europeias para o cuidado e uso de animais para

fins de investigação. Após o término do experimento, correspondendo a 14 e 28 dias de intoxicação, os animais foram submetidos à exsanguinação, imediatamente após a dessensibilização por choque elétrico. Logo em seguida, foram retirados o baço, o fígado e o trato gastrointestinal.

### 5.2.2 Análises Histopatológicas e Morfométricas

Após a eutanásia dos animais, foram coletadas amostras de fígado, baço, linfonodos mesentéricos e intestino (jejuno e íleo). Esses fragmentos foram fixados em solução de formalina tamponada a 10%, desidratada em solução de álcool com concentrações crescentes e embebidos em parafina. Seções de cinco  $\mu\text{m}$  foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para análise histopatológica.

Os achados histopatológicos foram graduados em pontuações (escores). O escore foi baseado na gravidade das alterações histopatológicas e severidade das lesões, conforme relatado anteriormente (Grenier et al., 2011; Bracarense et al., 2012).

A morfometria das vilosidades intestinais foi realizada utilizando o software MOTIC Image Plus 2.0 ML®. Foram mensuradas 30 vilosidades aleatórias de cada fragmento do intestino (jejuno e íleo) para determinar a altura média das vilosidades de cada tratamento.

### 5.2.3. Análise Estatística

Foram apresentadas as médias  $\pm$  erro padrão da média dos escores. Elas foram submetidas ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (Bartlett) e, na sequência, à análise de variâncias (ANOVA). Constatadas as diferenças, as médias foram submetidas ao teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizadas com auxílio do software Statistica 7.0 (2002).

## 5.3. RESULTADOS

Após 14 dias, as intoxicações com  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  de DON e DOM-1 não ocasionou alterações histopatológicas significativas ( $p \leq 0,05$ ) no fígado, nos linfonodos mesentéricos e no baço dos animais analisados (Figura 5.1A; C e E).

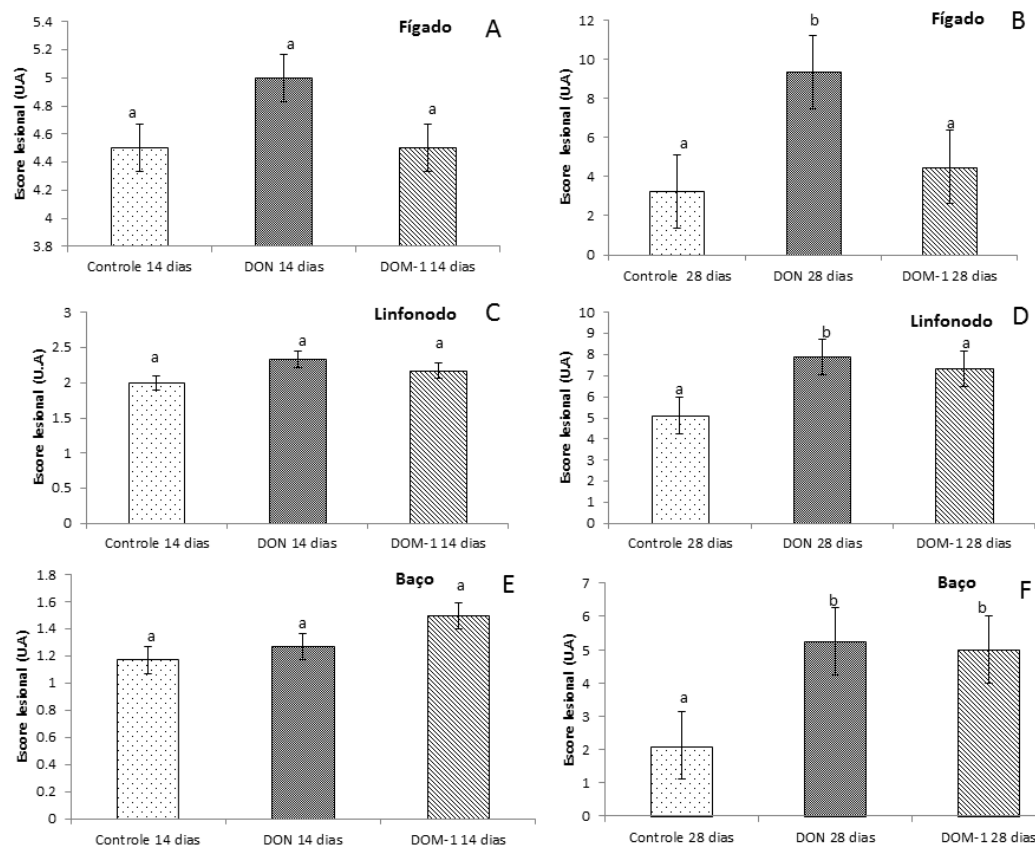
Já o tratamento com DON por 28 dias, apresentou aumento significativo das lesões no fígado dos animais, sendo que as principais alterações histopatológicas foram

desorganização trabecular, infiltrado inflamatório mononuclear leve, vacuolização citoplasmática e megalocitose moderada (Figura 5.2A). A morfologia hepática dos animais intoxicados com DOM-1 por 28 dias, apresentou discretas alterações morfológicas, não diferindo do escore do grupo controle (Figura 5.1B e 5.2B).

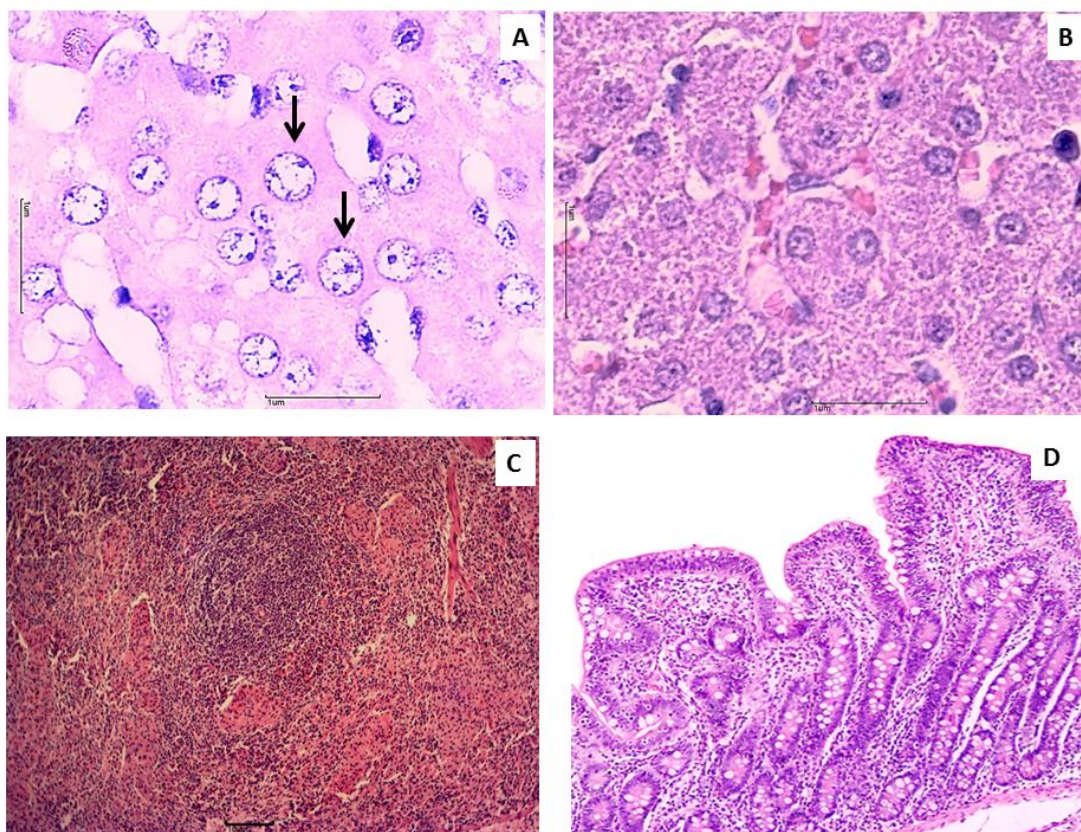
A morfologia dos linfonodos mesentéricos dos animais que receberam DOM-1 ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ ) por 28 dias não foi alterada de maneira significativa, e a intoxicação por DON nesse mesmo período, ocasionou alterações significativas ( $p \leq 0,05$ ) no linfonodos dos suínos, caracterizadas por depleção linfóide, com conseqüente aumento no escore lesional (Figura 5.1D).

No baço foi observado aumento significativo no escore lesional dos animais intoxicados com DON e DOM-1 após 28 dias (Figura 5.1F e 2C), sendo a principal alteração histopatológica observada a depleção linfóide.

**Figura 5.1.** Comparação entre as médias do escore lesional de fígado, linfonodo e baço de suínos intoxicados com DON e DOM-1 em diferentes doses e tempos. (A) Fígado: 14 dias; (B) Fígado: 28 dias; (C) Linfonodo: 14 dias. (D) Linfonodo 28 dias; (E) Baço: 14 dias; (F) Baço: 28 dias. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). U.A: Unidades Arbitrárias.



**Figura 5.2.** (A) Fígado de suíno intoxicado com DON 28 dias ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ ): vacuolização citoplasmática e megalocitose (setas) (HE 100X); (B) Fígado de suínos intoxicados com DOM-1 28 dias ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ ): hepatócitos normais (HE 100X); (C) Baço de suíno intoxicado com DON 28 dias ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ ): depleção de folículos linfóides (HE 20X); (D) Jejuno de suíno intoxicado com DON 28 dias ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ ): atrofia de vilosidades (HE 20X).



Após 14 dias de intoxicação por DON, houve aumento significativo do escore lesional no jejuno dos animais, em relação ao grupo controle, e a intoxicação com DOM-1, nesse mesmo período, não ocasionou alterações morfológicas importantes (Figura 5.3A).

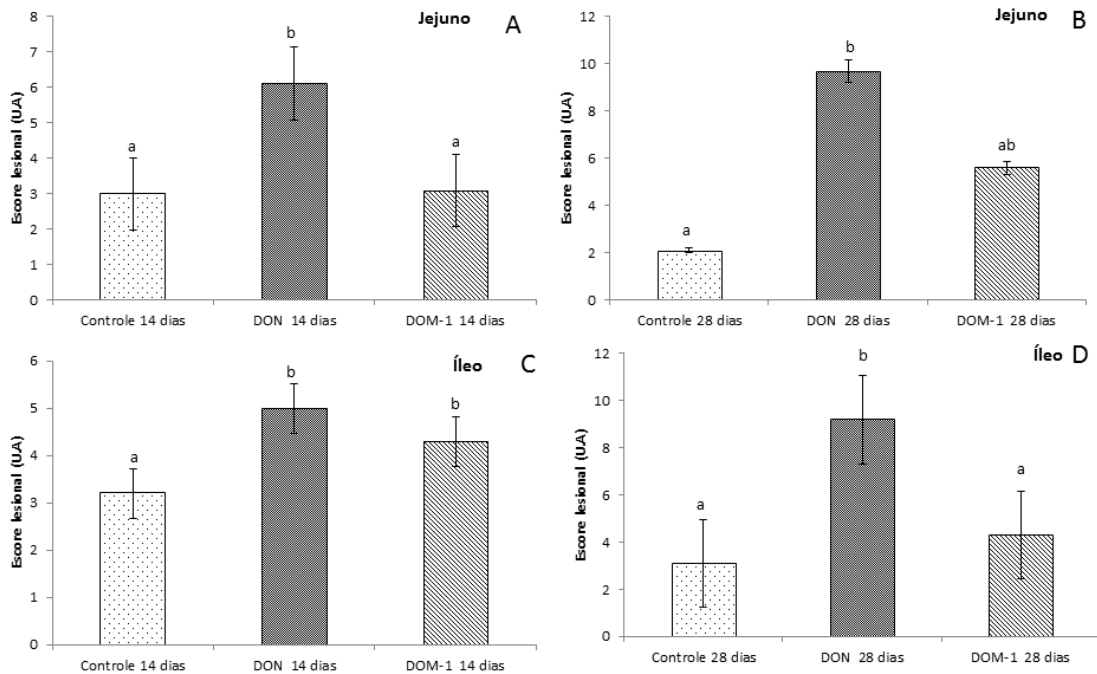
Após 14 dias, a intoxicação com DON e DOM-1 ocasionou atrofia e fusão das vilosidades intestinais com achatamento dos enterócitos no íleo dos suínos, com aumento significativo do escore lesional para ambas micotoxinas quando comparadas ao controle. Essa alteração observada no escore lesional do íleo, não foi confirmada na análise morfométrica, uma vez que a altura média das vilosidades se manteve semelhante ao controle após a intoxicação pelo DON e DOM-1 por 14 dias (Figura 5.3C; D e 5.4C; D).

Após 28 dias de intoxicação, o jejuno e o íleo foram sensíveis ao DON, com aumento significativo do escore lesional em relação ao controle (Figura 5.3B; D). As principais alterações histopatológicas observadas no jejuno e íleo foram: moderada à severa

atrofia e fusão das vilosidades, moderado achatamento dos enterócitos, edema de submucosa leve e degeneração citoplasmática.

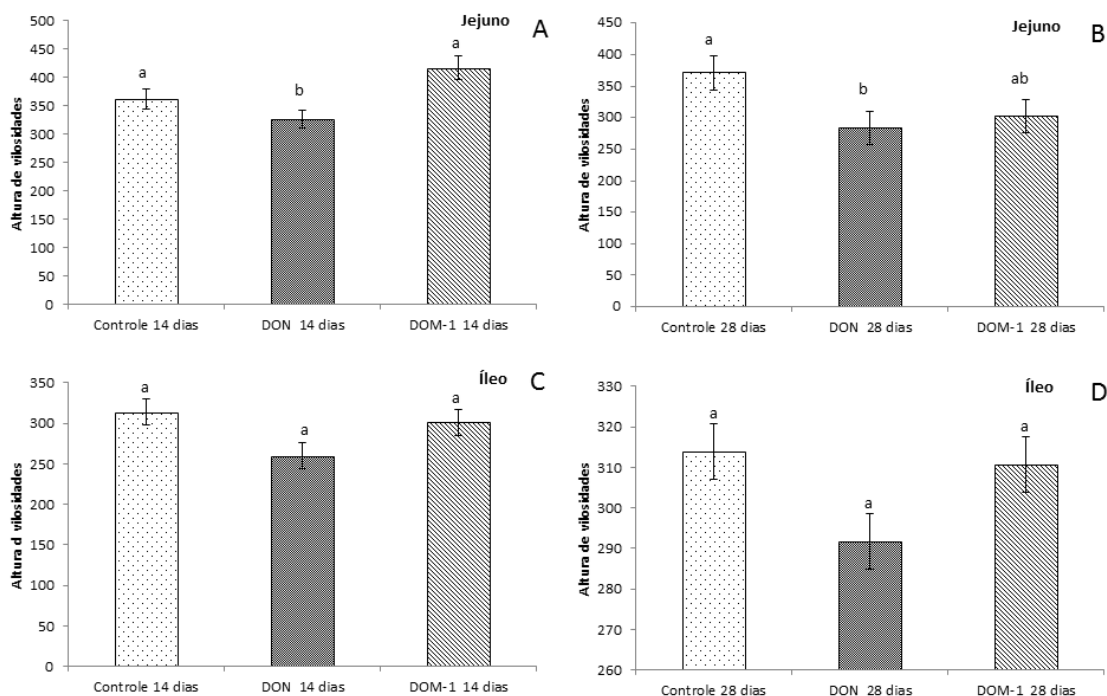
No jejuno, a intoxicação por 28 dias com DOM-1 ocasionou alterações morfológicas intermediárias em relação ao grupo controle e DON. Já no íleo essas alterações na morfologia não ocasionaram diferenças significativas entre o grupo intoxicado com DOM-1 e o controle (Figura 5.3B; D).

**Figura 5.3.** Comparação entre as médias do escore lesional de intestino de suínos intoxicados com DON e DOM-1 em diferentes doses e tempos. (A) Jejuno:14 dias; (B) Jejuno: 28 dias; (C) Íleo: 14 dias. (D) Íleo: 28 dias. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). U.A: Unidades Arbitrárias.



A análise morfométrica mostrou maior alteração no jejuno e íleo após 28 dias de intoxicação com o DON, enquanto que a intoxicação com DOM-1 no íleo manteve a morfometria semelhante ao controle e no jejuno o DOM-1 ocasionou alterações intermediárias (Figura 5.4B; D).

**Figura 5.4.** Comparação entre as médias da altura das vilosidades do intestino de suínos intoxicados com DON e DOM-1 em diferentes doses e tempos. (A) Jejuno: 14 dias; (B) Jejuno: 28 dias; (C) Íleo: 14 dias. (D) Íleo: 28 dias. Letras diferentes indicam médias significativamente diferentes pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



#### 5.4. DISCUSSÃO

Resultados prévios constataram que a toxicidade do DON é dose e tempo dependente, capaz de reduzir a resposta imunológica dos suínos (Bracarense et al., 2012; Gerez et al., 2015), no entanto, os resultados ainda são conflitantes para órgãos constituídos por células lábeis. No presente trabalho, o fígado dos suínos que receberam DON e DOM-1 por 14 dias não desenvolveram alterações morfológicas significativas. A avaliação da morfologia hepática após 28 dias de intoxicação com DON mostrou aumento significativo no escore lesional, sendo que este aumento foi três vezes maior, quando comparado ao grupo controle.

O desenvolvimento de lesões hepáticas após intoxicação com  $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  de DON durante 28 dias, pode ser decorrente do tempo de contato da micotoxina com o fígado do animal. Em mamíferos, após ingestão oral, DON chega ao fígado sem qualquer tipo de metabolização prévia (Pestka et al., 2008; Maresca, 2013), ocasionando lesões mais graves de acordo com o tempo de exposição à micotoxina. Esses resultados nos permitem enfatizar a

relação tempo-dependência da intoxicação de baixas doses de DON ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ ) no fígado de suínos.

Alterações morfológicas do fígado de suínos como desorganização trabecular, vacuolização citoplasmática e megalocitose foram observadas em animais intoxicados com doses mais elevadas que as testadas no presente estudo ( $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso vivo por 28 dias) (Gerez et al., 2015). Dessa forma, observa-se que a ingestão de baixas doses ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal) de DON por 28 dias foram suficientes para ocasionar lesões morfológicas semelhantes as encontradas após intoxicações com doses 10 vezes maiores.

DOM-1 apresentou toxicidade inferior a molécula nativa após 28 dias de intoxicação do fígado dos suínos, sendo que os animais que receberam o metabólito apresentaram escore lesional hepático semelhante ao grupo controle. Possivelmente, essa redução na toxicidade de DOM-1 em relação a DON é devida à alteração na conformação da molécula de DOM-1, que lhe confere menor polaridade, com conseqüente redução na capacidade reativa e de penetração nos hepatócitos (Pestka e Smolinski, 2005; Maresca, 2013).

O período de 14 dias de intoxicação com DON e DOM-1 na dose de  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  não ocasionou alterações significativas no baço e linfonodos mesentéricos. Dessa forma, a ingestão de baixas doses de DON ou DOM-1 em curtos períodos de tempo não foi capaz de alterar a morfologia dos órgãos linfóides e pode-se inferir que o *status* imunitário dos animais pode ser afetado.

Os órgãos linfóides podem apresentar diferenças na resposta a lesão devido a diferenças na maturação e diferenciação celular (Taranu et al., 2010), de maneira que no presente estudo foi observado aumento significativo no escore lesional do linfonodo nos animais do grupo intoxicado com DON ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$  por 28 dias), enquanto que os animais que receberam DOM-1 ( $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$  por 28 dias) apresentaram escore lesional semelhante ao controle, de maneira que o metabólito apresentou menor potencial tóxico.

No baço constatou-se aumento do escore lesional de 2,47 e 2,35 vezes com a intoxicação por DON e DOM-1, em relação ao controle. A principal alteração histopatológica nos órgãos linfóides foi depleção linfóide. A depleção dos folículos linfóides está associada à capacidade de DON de inibir a síntese proteica, afetando principalmente tecidos com alta capacidade de renovação celular, como o tecido linfóide, hematopoiético e células do trato gastrointestinal (Pinton et al., 2010).

A metabolização hepática pode ocasionar mudanças na molécula de DOM-1, revertendo-a novamente em DON. Nesse sentido, a menor toxicidade de DOM-1 nos

linfonodos mesentéricos pode ter ocorrido, pois estes receberam o metabólito logo após absorção, enquanto que, para alcançar o baço, DON é previamente metabolizado no fígado, proporcionando o aumento na polaridade da molécula e, conseqüentemente aumento na toxicidade (Maresca, 2013).

Estudos semelhantes ao nosso, utilizando o mesmo período de intoxicação (28 dias), porém com doses de DON de  $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso vivo também observaram, como principal alteração nos órgãos linfóides, a depleção dos folículos linfóides (Gerez et al., 2015). Ensaio realizado *in vitro* com cultivo celular de linhagens linfocíticas (Jurkat) com DON e DOM-1, também demonstrou menor efeito tóxico de DOM-1 quando comparado a DON, e o metabólito ainda não apresentou potencial indutor de apoptose e necrose, após sete e 24 horas de incubação com doses de 5 e  $10 \mu\text{M}$ , enquanto DON foi capaz de ocasionar aumento no índice apoptótico e necrose celular (Nasri et al., 2006).

A avaliação histopatológica do intestino dos animais intoxicados por 28 dias revelou que DON causou atrofia moderada à severa das vilosidades do jejuno constatada no escore lesional e análise morfométrica. A redução da altura de vilosidades é uma das conseqüências da diminuição da proliferação celular causada por DON (Bracarense et al., 2012; Pinton et al., 2012).

Trabalhos com intoxicação *in vivo* com DON ( $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$  de alimento por 28 dias) e *ex vivo* (dose correspondente a  $3 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal), também observaram como principais alterações histopatológicas no intestino de suínos, atrofia e fusão das vilosidades (Bracarense et al., 2012; Pinton et al., 2012; Basso et al., 2013; Gerez et al., 2015), alterações semelhantes às observadas no presente estudo.

DOM-1 após administração por 14 dias com baixas doses ( $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ocasionou alterações histopatológicas significativas apenas no íleo, sendo que o jejuno não foi significativamente alterado. Após 28 dias, DOM-1 ocasionou alterações histopatológicas intermediárias, em jejuno quando comparado a DON, mas não ocasionou alterações no íleo. Apesar de diferentes respostas de acordo com o segmento intestinal, os resultados refletem uma menor toxicidade do metabólito em relação à molécula nativa sobre o intestino animal, sendo que essa menor toxicidade pode ser atribuída à redução na polaridade do DOM-1, que reduz sua capacidade em penetrar nos enterócitos (Maresca, 2013).

Por meio da avaliação histopatológica do jejuno, íleo, fígado e linfonodos de suínos, foi possível constatar os efeitos tóxicos de DON após intoxicação por  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso vivo por 35 dias, devido o desenvolvimento de graves alterações morfológicas nesses órgãos (Zielonka et al., 2009).

Os resultados da intoxicação por DOM-1 apresentaram variações de acordo com o órgão analisado, o que já é esperado, devido a via de absorção e distribuição no organismo, mas, de forma geral, mostrou menor potencial tóxico ao organismo quando comparado aos efeitos ocasionados por DON.

## 5.5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que a toxicidade de DON foi tempo-dependente, uma vez que as alterações morfológicas no fígado, intestino e órgãos linfóides dos suínos foram mais severas após 28 dias de exposição ao DON ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ ), do que no período de 14 dias com doses de  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Ao comparar a toxicidade de DON a DOM-1 ao organismo dos suínos, o metabólito mostrou menor toxicidade ao fígado, linfonodo mesentérico e intestino independente do período de exposição.

## REFERÊNCIAS

BASSO, K.; GOMES, F.; BRACARENSE, A. P. L. Deoxynivalenol and Fumonisin, Alone or in Combination, Induce Changes on Intestinal Junction Complexes and in E-Cadherin Expression. **Toxins**, v. 5, n. 12, p. 2341-2352, 2013.

BERTHILLER, F. et al. Masked mycotoxins: A review. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 57, p. 165-183, 2013.

BRACARENSE, A. P. F. L. et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition** v. 107, p. 1776–1786, 2012.

ESCRIVÁ, L.; FONT, G.; MANYES, L. In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 78, p. 185–206, 2015.

GEREZ, J. R. et al. Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, p. 89–98, 2015.

GRENIER, B. et al. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisin in piglets. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, p. 761–771, 2011.

GUILLOTEAU, P. et al. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 4–22 2010.

LEBRUN, B. et al. Dysregulation of energy balance by trichothecene mycotoxins: Mechanisms and prospects. **NeuroToxicology**, v. 49, p. 15-27, 2015.

MARESCA, M. From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. **Toxins**, v. 5, p. 784-820, 2013.

NASRI, T. et al. Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 20 p. 832–840, 2006.

PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Archives of Toxicology**, v. 84, p. 663-679, 2010.

PESTKA, J. J.; ISLAM, Z.; AMUZIE, C. J. Immunochemical assessment of deoxynivalenol tissue distribution following oral exposure in the mouse. **Toxicology Letters**, v. 178, p. 83–87, 2008.

PESTKA, J. J.; SMOLINSKI, A. T. Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 8, p. 39–69 2005.

PESTKA, J. J. et al. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 61–73, 2004.

PINTON, P. et al. Deoxynivalenol Impairs Porcine Intestinal Barrier Function and Decreases the Protein Expression of Claudin-4 through a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Mechanism. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 1956–1962, 2010.

PINTON, P. et al. The effect on the intestine of some fungal toxins: The trichothecenes. **Current Immunology Reviews**, v. 8, p. 193–208, 2012.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed **Toxins**, v. 4, p. 663-675, 2012.

ZIELONKA, Ł. et al. Influence of low doses of deoxynivalenol on histopathology of selected organs of pigs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 12, n. 1, p. 89-95, 2009.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

A toxicidade do DON é dependente da dose e período de exposição. Após intoxicação com  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  por 30 dias, essa micotoxina comprometeu o metabolismo hepático em ratos, confirmadas por meio das alterações histopatológicas acentuadas, e um efeito imunossupressor, comprovado por alterações morfológicas e imunoistoquímicas no baço e linfonodos dos ratos.

Em suínos o DON ocasionou graves alterações morfológicas no fígado, órgãos linfóides e intestino. Mesmo na menor dose ( $0,15 \text{ mg kg}^{-1}$ ) após 28 dias de ingestão, ocasionou alterações morfológicas graves no fígado, com consequente comprometimento da função hepática, e alterações tempo dependente no fígado e intestino.

O DOM-1 apresentou menor toxicidade ao organismo de suínos, quando comparado à molécula nativa. A ingestão de  $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$  por 14 dias ou  $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$  por 28 dias de DOM-1 ocasionaram leves alterações morfológicas e histopatológicas no baço, linfonodos mesentéricos e intestino e a toxicidade do metabólito não alterou significativamente o funcionamento do intestino, órgãos linfóides e status imunitário dos suínos.



ANEXO I: Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas estabelecidos pela Agência nacional de vigilância sanitária Anvisa- Brasil. (Aplicação em 2011).

<b>Micotoxinas</b>	<b>Alimento</b>	<b>LMT (µg/kg)</b>
<b>Aflatoxina M1</b>	Leite fluído	<b>0,5</b>
	Leite em pó	<b>5</b>
	Queijos	<b>2,5</b>
<b>Aflatoxinas B1, B2, G1, G2</b>	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	<b>5</b>
	Feijão	<b>5</b>
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	<b>10</b>
	Frutas desidratadas e secas	<b>10</b>
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	<b>20</b>
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	<b>10</b>
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	<b>15</b>
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	<b>1</b>
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	<b>1</b>
	Amêndoas de cacau	<b>10</b>
	Produtos de cacau e chocolate	<b>5</b>
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce); Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma). Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	<b>20</b>
	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	<b>20</b>
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolos de milho	<b>20</b>
<b>Ocratoxina A</b>	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	<b>10</b>

	Feijão	<b>10</b>
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	<b>10</b>
	Vinho e seus derivados	<b>2</b>
	Suco de uva e polpa de uva	<b>2</b>
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta de caiena e pimentão-doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a pimenta branca e a pimenta preta) Myristica fragrans (noz-moscada) Zingiber officinale (gengibre) Curcuma longa (curcuma) Misturas de especiarias que contenham uma ou mais das especiarias acima indicadas	<b>30</b>
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	<b>2</b>
	Produtos de cacau e chocolate	<b>5,0</b>
	Amêndoa de cacau	<b>10</b>
	Frutas secas e desidratadas	<b>10</b>
<b>Desoxinivalenol (DON)</b>	Arroz beneficiado e derivados	<b>750</b>
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	<b>200</b>
<b>Fumonisin (B1 + B2)</b>	Milho de pipoca	<b>2000</b>
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	<b>200</b>
<b>Zearalenona</b>	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	<b>20</b>
<b>Patulina</b>	Suco de maçã e polpa de maçã	<b>50</b>

Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas estabelecidos pela Agência nacional de vigilância sanitária Anvisa- Brasil. (Aplicação em janeiro de 2012).

<b>Micotoxinas</b>	<b>Alimento</b>	<b>LMT (µg/kg)</b>
<b>Desoxinivalenol (DON)</b>	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	<b>2000</b>
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	<b>1750</b>
<b>Fumonisin (B1 + B2)</b>	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	<b>2500</b>
	Amido de milho e outros produtos à base de milho	<b>2000</b>
<b>Zearalenona</b>	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada	<b>200</b>
	Arroz beneficiado e derivados	<b>200</b>
	Arroz integral	<b>800</b>
	Farelo de arroz	<b>1000</b>
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e subprodutos à base de milho	<b>300</b>
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	<b>400</b>

Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas estabelecidos pela Agência nacional de vigilância sanitária Anvisa- Brasil. (Aplicação em janeiro de 2014).

<b>Micotoxinas</b>	<b>Alimento</b>	<b>LMT (µg/kg)</b>
<b>Ocratoxina A</b>	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada	<b>20</b>
<b>Desoxinivalenol (DON)</b>	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	<b>3000</b>
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	<b>1500</b>
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	<b>1250</b>

<b>Fumonisin (B1 + B2)</b>	Milho em grão para posterior processamento	<b>5000</b>
<b>Zearalenona</b>	Milho em grão e trigo para posterior processamento	<b>400</b>

Limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas estabelecidos pela Agência nacional de vigilância sanitária Anvisa- Brasil. (Aplicação em janeiro de 2016)

<b>Micotoxinas</b>	<b>Alimento</b>	<b>LMT (µg/kg)</b>
<b>Desoxivalenol (DON)</b>	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada	<b>1000</b>
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	<b>750</b>
<b>Fumonisin (B1 + B2)</b>	Farinha de milho, creme de milho, fubá, flocos, canjica, canjiquinha	<b>1500</b>
	Amido de milho e outros produtos a base de milho	<b>1000</b>
<b>Zearalenona</b>	Farinha de trigo, massas, crackers e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	<b>100</b>
	Arroz beneficiado e derivados	<b>100</b>
	Arroz integral	<b>400</b>
	Farelo de arroz	<b>600</b>
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos à base de milho	<b>150</b>
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo	<b>200</b>