



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

KARINA MARIA BASSO

**EFEITOS DAS MICOTOXINAS DESOXINIVALENOL E  
FUMONISINA B1 SOBRE EXPLANTES INTESTINAIS DE  
SUÍNOS**

---

Londrina  
2013

KARINA MARIA BASSO

**EFEITOS DAS MICOTOXINAS DESOXINIVALENOL E  
FUMONISINA B1 SOBRE EXPLANTES INTESTINAIS DE  
SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (Área de Concentração em Sanidade Animal) da Universidade Estadual de Londrina como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca  
Central da Universidade Estadual de Londrina**

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

B322e Basso, Karina Maria  
Efeitos das mitoxinas desoxinivalenol e fumonisina b1 sobre explantes  
intestinais de suínos. – Karina Maria Basso. – Londrina, 2013.  
78 f. : il.

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, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Suíno – Doenças. 2. Micotoxinoses em animais. 3. Micotoxinas. 4. Modelos  
animais em pesquisas. 5. Toxicologia – Modelos animais. 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: 636.4

KARINA MARIA BASSO

**EFEITOS DAS MICOTOXINAS DESOXINIVALENOL E FUMONISINA  
B1 SOBRE EXPLANTES INTESTINAIS DE SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof.<sup>a</sup> orientadora Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Frederico  
Rodrigues Loureiro Bracarense  
UEL – Londrina – PR

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Graziela Draciunas Pacheco  
UEL – Londrina – PR

---

Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Roberta Lemos Freire  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 12 de Março de 2013.

## AGRADECIMENTOS

Momentos, pessoas, experiências, assim a vida é completa. De bons momentos, outros não tão bons assim, mas nas dificuldades a força nasce de onde menos se espera, nos anima, ensina e fortalece. Nos prepara pessoas melhores, melhores profissionais, melhores seres humanos. Assim se completa a vida, colhendo o amor de quem o tem, dando-o a quem nunca teve a alegria de recebê-lo.

De etapas se cumpre a vida, nestas etapas somos surpreendidos, pois a força volta a surgir de onde menos se espera, nos fazendo pessoas mais sensíveis, amigas, felizes e satisfeitas. Satisfeitas com o que temos, com o que somos, com o que recebemos... Poucos sabem retribuir o que receberam, mas assim se cumpre a vida.

Assim meu mais sincero obrigada às várias pessoas que fizeram parte da minha vida nestes dois anos, cada um a seu modo, mas nenhuma menos importante. Assim agradeço a professora e orientadora Ana Paula F.R.L. Bracarense, por todo o tempo de dedicação, paciência e ensinamentos, para realização deste projeto, assim como pelas conversas e conselhos.

A toda a equipe do Laboratório de Anatomia Veterinária: A residente e amiga Renata Madureira, aos pós-graduandos e amigos: Juliana Rúbira Gerez, Isabela Guanier, Rogério Marcasso, Elisangela Olegário, a médica veterinária Claudia Boselli, cada um a sua maneira contribuiu para a realização deste trabalho, amenizou momentos difíceis e alegrou outros.

As amigas Letícia Yamasaki, Thalísie Drape, Roberta Abrami, pela ajuda no trabalho, conversas, todo apoio e as boas risadas.

Ao professor Antonio Carlos Reis e professora Giovanna Di Santi pelo carinho e convivência neste período.

A Dra. Luciene e ao José do Laboratório de Microbiologia, pela atenção e tempo gasto me auxiliando para realização do trabalho.

A professora Célia Guadalupe e ao técnico em microscopia eletrônica Oswaldo, pela disposição em ensinar, e todo tempo gasto para processamento e análise das amostras.

A minha família, base da minha formação; alicerces 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.

Ao meu namorado José Francirlei, presente em minha vida em todos os momentos, por toda ajuda na realização deste trabalho, carinho e paciência nos vários momentos de ansiedade, nervoso e estresse.

As amigas Bárbara Fachini Agostinho e Daniella Voltarelli, que mesmo longe sempre estiveram presentes em minha vida.

“Tudo quanto vive, vive porque muda; muda porque passa; e porque passa, morre.  
Tudo quanto vive perpetuamente se torna outra coisa,  
constantemente se nega, se furta à vida.”

*Fernando Pessoa.*

BASSO, Karina Maria. **Efeitos das micotoxinas desoxinivalenol e fumonisina B1 sobre explantes intestinais de suínos**. 2013. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O modelo *ex vivo* que muitas vezes se utiliza do suíno como modelo animal devido a similaridade com o organismo do ser humano, foi desenvolvido na década de 30. Nos últimos anos em decorrência de aspectos éticos e legais em pesquisas laboratoriais, foi redescoberto como técnica promissora e eficaz nos estudos da ação das micotoxinas no organismo. Contudo, a idade dos animais para realização da técnica e os mecanismos de ação das micotoxinas sobre o trato gastrointestinal ainda não são consenso na literatura. Objetivou-se com o estudo padronizar a técnica de cultivo de explantes e avaliar os efeitos de fusariotoxinas no intestino de suínos. Explantes de jejuno de leitões abatidos com 24 e 42 dias foram cultivados em meio de cultura DMEM, acrescido de aditivos e antibióticos, durante 2 e 4 horas de incubação e analisados por histologia, morfometria e ultraestrutura. Após a avaliação histológica e morfométrica, os explantes provenientes de animais de 24 dias se mostraram com melhor preservação quando comparados aos de 42 dias de vida. A maior idade resultou em redução significativa no escore histológico e de maneira geral pior preservação da estrutura intestinal. Os explantes com melhor viabilidade celular (provenientes de suínos com 24 dias de vida) foram incubados em estufa a 37°C na presença de fumonisina B1 (100 µM) e desoxinivalenol (10µM), isoladas e em associação, e analisados por histologia, imuno-histoquímica, morfometria, ultraestrutura e densidade de células caliciformes. Os explantes dos animais de 24 dias após 4 horas de incubação demonstraram menores danos teciduais e mantiveram-se viáveis e funcionais, comprovados pela presença de vesículas de pinocitose nos enterócitos. A incubação dos explantes de animais de 24 dias por 4 horas na presença das micotoxinas demonstrou alterações histológicas mais severas no grupo tratado com desoxinivalenol. Este grupo apresentou ainda redução na altura de vilosidades e densidade de células caliciformes e redução na expressão da E-caderina, enquanto o grupo tratado com fumonisina apresentou alterações histológicas moderadas com redução na altura de vilosidades e densidade de células caliciformes e redução na expressão da E-caderina. Em relação à análise histológica o grupo exposto as duas micotoxinas associadas, apresentou efeitos semelhantes ao do grupo tratado com desoxinivalenol, indicando que não houve interação entre as micotoxinas. No grupo exposto as duas micotoxinas não foi avaliada a expressão da E-caderina, devido às alterações morfológicas severas observadas na histologia. A presença de micotoxinas ocasionou a diminuição nas funções absorptiva, imunitária e de barreira física principalmente quando na presença do desoxinivalenol e na associação das micotoxinas.

**Palavras-chave:** Cultivo de órgãos. Explantes. Fusariotoxinas. Intestino. Leitões.



BASSO, Karina Maria. **Effect of the micotoxin fumonisin b1 and deoxynivalenol in intestinal explant swine**. 2013. 78f. Dissertation (Master in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2013.

### **ABSTRACT**

The ex vivo model who often uses the pig as an animal model because of the similarity with the human body, was developed in the 30s, in recent years, due to legal and ethical issues in research laboratory, was rediscovered as technical promising and effective in studies of the action of mycotoxins in the body, however, the age of the animals to perform the technique and the mechanisms of action of mycotoxins on the gastrointestinal tract is not a consensus in the literature. The study objective was to standardize cultivation of explants and evaluate the effects of fusariotoxinas intestine of pigs. Jejunal explants of piglets at 24 and 42 days were cultured in DMEM culture medium plus additives and antibiotics for 2 and 4 hours of incubation and analyzed by histology, morphometry and ultrastructure. Since after the histological and morphometric analysis, the explants from animals 24 days proved a better preservation compared to 42 days. The higher age resulted in significant reduction in tissue score and generally worse preservation of intestinal structure. the explants with better cell viability (from pigs at 24 days of life) were incubated at 37°C in the presence of fumonisin B1 (100 µM) and deoxynivalenol (10 µM), alone and in combination, and analyzed by histology, immunohistochemistry, morphometry, ultrastructure and goblet cell density. The explants from animals 24 days after 4 hours of incubation showed less tissue damage and remained viable and functional, demonstrated by the presence of vesicles in the enterocytes pinocytosis. The incubation of the explants from animals 24 days for 4 hours in the presence of mycotoxins demonstrated histological changes more severe in the group treated with deoxynivalenol, this group also showed reduction in height of villi and goblet cell density and decreased expression of e-cadherin, while the group treated with fumonisin B1 showed histological changes moderate, with reduction in height of villi, goblet cell density and decreased expression of e-cadherin. The group exposed both mycotoxins, presented similar effects to that of the group treated with deoxynivalenol, indicating no interaction between mycotoxins. In the group exposed to two mycotoxins was not assessed the expression of e-cadherin due to severe morphological alterations observed on histology analyse. The presence of mycotoxins caused the decrease in absorptive functions, immune and physical barrier especially when in the presence of association between deoxynivalenol and association of mycotoxins.

**Key words:** Explants. Fusariotoxin. Gut. Organ culture. Piglets.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 2.2.1</b> –Estrutura química da fumonisina B1.....	25
<b>Figura 2.3.2</b> –Estrutura química do desoxinivalenol.....	28
<b>Figure 4.3.1</b> –Jejunal explants from piglets with 24 and 42 days old. A to C – 24 days old pigs and D to F – 42 days old pigs. (A) and (D) Non-incubated explants showing normal villi; (B) Explant after 2 hours of incubation. Mild villi atrophy (arrow); (C) Explant after 4 hours of incubation. Mild villi atrophy and fusion (arrow); (E) Explant after 2 hours of incubation. Mild villi atrophy and focal loss of apical enterocytes (arrow); (F) Explant after 4 hours of incubation. Severe atrophy and villi fusion, loss of apical enterocytes, and cellular debris (arrow). (H.E. Objective 10x).....	47
<b>Figure 4.3.2</b> –(A) Tissue score in jejunal explants from piglets with 24 and 42 days old in different times of incubation. (B) Mean villi height ( $\mu\text{m}$ ) in jejunal explants from piglets with 24 and 42 days old.  Piglets with 24 days old.  Piglets with 42 days old. Different capital letters mean significant difference between ages. Different lower cases mean significant difference between control and incubated explants. ( $p \leq 0.05$ , Kruskal-Wallis Test). AU - arbitrary units.....	48
<b>Figure 4.3.3</b> –Jejunal explants from piglets with 24 days old. Electron micrographs of explants after 4 hours of incubation. (A) Enterocyte monolayer lining the gut (Bar 2 $\mu\text{m}$ ). (B) Microvilli in the apical membrane of enterocytes (Bar 500 nm) (C) Endocytic vesicle in the apical cytoplasm (Bar 500 nm).....	48
<b>Figura 5.3.1</b> –Explantes de jejuno de suíno. (A) Controle. Edema de lâmina própria, discreta atrofia de vilosidades (seta) (H.E Barra 100 $\mu\text{m}$ ) (B) FB1. Desnudamento apical (cabeça seta), fusão moderada (seta) e atrofia severa das vilosidades (H.E Barra 100 $\mu\text{m}$ ) (C) DON. Desnudamento apical severo, fusão e atrofia severa (seta) (H.E Barra 100 $\mu\text{m}$ ) (D). FB1+DON. Achatamento do epitélio intestinal, atrofia e fusão das vilosidades (seta) (H.E Barra 100 $\mu\text{m}$ ).....	55
<b>Figura 5.3.2</b> –Escore teciduais (média $\pm$ desvio-padrão) de explantes intestinais de suínos expostos à fumonisina, desoxinivalenol e ambas as	

micotoxinas. Letras diferentes mostram diferença significativa entre os tratamentos (Teste Tukey $p \leq 0,05$ ). UA = unidades arbitrárias .....	56
<b>Figura 5.3.3</b> –Número de células caliciformes por vilosidade (média $\pm$ desvio padrão) explantes intestinais de suínos tratados com FB1, DON e FB1 +DON. Letras diferentes mostram diferença significativa entre os tratamentos (Teste Kruskall Wallis) .....	56
<b>Figura 5.3.4</b> –Altura de vilosidades (média $\pm$ Desvio padrão) em explantes intestinais de suínos tratados com FB1, DON e FB1+DON. Letras diferentes mostram diferença significativa entre os tratamentos (Teste Tukey, $p \leq 0,05$ ).....	57
<b>Figura 5.3.5</b> –Explantes de jejuno de leões tratados com micotoxinas. A. Controle. Células caliciformes (seta) (Alcian-blue. Barra 100 $\mu\text{m}$ ). B. DON. Redução no número de células caliciformes (Alcian-blue. Barra 100 $\mu\text{m}$ ). C. Controle. Expressão forte e homogênea para E-caderina (IHQ Barra 100 $\mu\text{m}$ ). D. FB1. Redução na expressão de E-caderina (IHQ Barra 100 $\mu\text{m}$ ) .....	58
<b>Figura 5.3.6</b> –Análise ultraestrutural de explantes de jejuno de suínos tratados com FB1 e DON. A. Controle: Integridade de microvilosidades e do citoplasma dos enterócitos (Bar 500 nm) B. Controle. Estruturas juncionais (seta) preservadas e grânulos de glicogênio dispersos no citoplasma (Bar 2 $\mu\text{m}$ ). C. FB1. Descamação celular (cabeça seta) e perda de microvilosidades (seta) (Bar 2 $\mu\text{m}$ ). D. Aumento do espaço intercelular e projeções citoplásmicas (seta) (Bar 5 $\mu\text{m}$ ). E. DON. Descamação dos enterócitos e debris celulares (Bar 10 $\mu\text{m}$ ) .....	59

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
2.1 – EXPLANTES TECIDUAIS: UM MODELO REDESCOBERTO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL .....	15
2.1.1 – Histórico do Cultivo de Explantes .....	16
2.1.2 – Vantagens da Técnica .....	18
2.1.3 – Órgãos de Suínos Cultivados .....	18
2.1.3.1 – Intestino .....	18
2.1.3.2 – Sistema respiratório .....	19
2.1.3.3 – Articulação .....	19
2.1.3.4 – Endométrio .....	20
2.1.3.5 – Pele .....	20
2.1.4 – Conclusão .....	21
2.2 – MICOTOXINAS .....	21
2.2.1 – Fumonisinias .....	24
2.2.1.1 – Aspectos epidemiológicos .....	24
2.2.1.2 – Estrutura físico-química da FB1 .....	25
2.2.1.3 – Toxicologia e mecanismo de ação .....	25
2.2.1.4 – Toxicidade aguda .....	26
2.2.1.5 – Toxicidade crônica .....	26
2.3 – DESOXINIVALENOL .....	27
2.3.1 – Aspectos Epidemiológicos .....	27
2.3.2 – Estrutura Físico-química .....	28
2.3.3 – Toxicidade e Mecanismo de Ação .....	29
2.3.4 – Toxicidade Aguda .....	29
2.3.5 – Toxicidade crônica .....	30
2.4 – CONCLUSÃO .....	30
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	31

<b>3 OBJETIVOS</b> .....	38
3.1 – GERAL.....	38
3.2 – ESPECÍFICOS.....	38
<b>4 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO 1</b> .....	39
<b>Effect of Age on the Viability of Pig Intestinal Explants: a Histological and Ultrastructural Approach 1</b> .....	39
<b>Abstract</b> .....	39
4.1 – <b>Introduction</b> .....	39
4.2 – <b>Material and Methods</b> .....	40
4.2.1 – <i>Jejunal explant culture</i> .....	40
4.2.2 – <i>Histological and ultrastructural assays</i> .....	41
4.2.3 – <i>Histological and ultrastructural assays</i> .....	41
4.2.4 – <i>Statistical analysis</i> .....	42
4.3 – <b>Results</b> .....	42
4.3.1 – <i>Histological and morphometrical assays</i> .....	42
4.3.2 – <i>Ultrastructural analysis</i> .....	43
4.4 – <b>Discussion</b> .....	43
4.5 – <b>Acknowledgements</b> .....	45
<b>References</b> .....	45
<b>5 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO 2</b> .....	49
<b>Efeitos de Fusariotoxinas em Explantes Intestinais de Suínos: Avaliação Histológica, Imuno-Histoquímica Ultraestrutural</b> .....	49
<b>Resumo</b> .....	49
<b>Abstract</b> .....	49
5.1 – <b>Introdução</b> .....	49
5.2 – <b>Material e Métodos</b> .....	51
5.2.1 – <i>Animais</i> .....	51
5.2.2 – <i>Cultura de explantes e exposição a FBI e DON</i> .....	51
5.2.3 – <i>Análise histológica e morfológica</i> .....	52
5.2.4 – <i>Análise imuno-histoquímica</i> .....	53
5.2.5 – <i>Análise ultraestrutural</i> .....	53
5.2.6 – <i>Análise estatística</i> .....	54



## 1 INTRODUÇÃO

A técnica *ex vivo* foi desenvolvida na década de 30 e, nos últimos anos, em decorrência de aspectos éticos e legais em experimentos laboratoriais, foi redescoberta como técnica promissora e eficaz nos estudos da ação das micotoxinas no organismo (KOLF-CLAUW et al., 2009). Ela permite associar condições experimentais controladas e a redução do número de animais em relação aos experimentos *in vivo* (RANDALL et al., 2011).

A técnica de explantes muitas vezes utiliza o suíno como modelo animal, uma vez que esta espécie compartilha alta similaridade em vários sistemas orgânicos com o ser humano (GUILLOTEAU et al., 2010), como do trato digestório, provavelmente devido à alimentação onívora que apresentam (SWINDLE; SMITH, 1998).

Nesse sentido, explantes de intestino (KOLF-CLAUW et al., 2009), pele (DAME et al., 2008), articulação (OTSUKI et al., 2008), pulmão e brônquios (POUCKE et al., 2010) de suínos têm sido utilizados na experimentação animal, com finalidades diversas, como a avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas, carcinogênicas, terapêuticas, agentes biológicos ou testes de sensibilidade. A utilização da técnica permite minimizar problemas éticos e a falta de material humano que a pesquisa encontra. No entanto, uma das maiores limitações da técnica é o tempo de viabilidade celular devido à hipóxia a qual o tecido é submetido durante o tempo de cultivo (RANDALL et al., 2011).

O trato gastrointestinal é a primeira barreira física contra agentes patogênicos, substâncias tóxicas, e é a principal via de absorção de nutrientes, água e medicamentos para o corpo, sendo, de fundamental importância para o desenvolvimento e manutenção do organismo vivo (GARTNER; HIATT, 2007). Dessa maneira, este órgão é submetido a altas concentrações de micotoxinas, devido à ingestão de alimentos contaminados (DILKIN et al., 2010).

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que afetam a produção de grãos e produtos de origem vegetal. Dentre estas, as fusariotoxinas, como a fumonisina B1 (FB1) e o desoxinivalenol (DON), têm grande impacto na saúde humana e animal devido à alta toxicidade que apresentam (DILKIN et al., 2010). A toxicidade de FB1 foi comprovada em várias espécies animais, ocasionando edema pulmonar em suínos, leucoencefalomalácia em equinos e câncer esofágico e hepático em seres humanos. O DON, de acordo com a dose ingerida, ocasiona vômito, diarreia e alterações de comportamento como refugagem de alimento, redução no crescimento e ou falhas reprodutivas em suínos (MINAMI et al., 2004). As micotoxinas FB1 e DON estão presentes naturalmente nos cereais

e produtos industrializados e a contaminação, na maior parte das vezes, não acontece isoladamente. Os alimentos podem apresentar multi-contaminações, e até o momento pouco se sabe da ação conjunta destas micotoxinas sob a barreira intestinal (GRENIER et al., 2011).

As alterações celulares que as micotoxinas são capazes de ocasionar no epitélio intestinal não estão esclarecidas e, devido à importância relacionada à saúde pública e agroeconômica, estudos que buscam elucidar os mecanismos celulares que a FB1 e DON, isolados ou em associação, ocasionam ao intestino, podem auxiliar na busca de tratamentos e medidas preventivas visando diminuir as perdas econômicas e risco de contaminação aos animais e seres humanos.

## REFERÊNCIAS

- DAME, M. K.; SPAHLINGER, D. M.; SILVA, M.; PERONE, P.; DUNSTAN, R.; VARANI, J. Establishment and characteristics of Gottingen mini pig skin in organ culture and monolayer cell culture: relevance to drug safety testing. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**. v. 44, p. 245–252, 2008.
- DILKIN, P.; DIREITO, G.; SIMAS, M. M. S.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B. Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisin B1 containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. **Chemico-Biological Interactions**. v. 185, p. 157–16, 2010.
- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sistema Digestivo: Tubo Digestivo. In\_ **Tratado de histologia em cores** [Tradução de. Debora Milagres Pereira] 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 387-416.
- GRENIER, B.; OSWALD, I. P. Mycotoxin co-contamination of foods and feeds: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. **World Mycotoxin Journal**. v. 4, p. 285–313, 2011.
- GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H. M.; METGES, C. C. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? **Nutrition Research Reviews**. v. 23, p. 4-22, 2010.
- KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. 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.
- MINAMI, L.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E. Y. S. Fumonisin: efeitos toxicológicos, mecanismo de ação e biomarcadores para avaliação da exposição. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 25, p. 207-224, 2004.
- OTSUKI, S.; BRINSON, D. C.; CREIGHTON, L.; KINOSHITA, M.; SAH, R. L.; D’LIMA, D.; LOTZ, M. The Effect of glycosaminoglycan loss on chondrocyte viability. **Arthritis & Rheumatism**. v. 58, p. 1076–1085, 2008.
- POUCKE, S. G. M. V.; NICHOLLS, J. M.; NAUWYNCK, H. J.; REETH, K. V. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution **Virology Journal**. v. 7, p. 1-14, 2010.
- RANDALL, K. J.; 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.
- SWINDLE, M. M.; SMITH, A. C. Comparative and physiology of the pig. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**. suppl 1, v. 25, p. 11-21, 1998.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – EXPLANTES TECIDUAIS: UM MODELO REDESCOBERTO NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Por apresentar notável semelhança ao ser humano, cada vez mais o suíno tem sido empregado como modelo animal em estudos laboratoriais. Estas semelhanças são observadas em diversos sistemas orgânicos, sendo os sistemas gastrointestinal, cardiovascular e pulmonar os mais utilizados em pesquisas laboratoriais (GUILLOTEAU et al., 2010). Outros órgãos como a pele, o fígado e a vesícula biliar dos suínos também são utilizados em modelos experimentais para seres humanos (SWINDLE; SMITH, 1998).

O trato gastrointestinal é a primeira barreira física contra agentes patogênicos, assim como substâncias químicas, sendo ainda a principal via de absorção de nutrientes, água e medicamentos para o corpo, fundamental para o desenvolvimento e manutenção do organismo vivo (GARTNER; HIATT, 2007). A similaridade do trato gastrointestinal do homem e do suíno se dá em vários aspectos como digestão, absorção e metabolismo, o que favorece a utilização do suíno em experimentos laboratoriais, em relação a outros animais (GUILLOTEAU et al., 2010). Tempo de transporte pelo trato gastrointestinal, modo de absorção de nutrientes, transporte de íons e motilidade intestinal, semelhantes ao ser humano também são fatores que favorecem a utilização dos suínos, em relação a outros animais (SWINDLE; SMITH, 1998). Essas características compartilhadas provavelmente são devido ao tipo de dieta onívora que as duas espécies apresentam.

Outros dois sistemas que utilizam o suíno como modelo animal são o cardiovascular e o pulmonar. O tamanho e a morfologia são próximos ao do ser humano, além da semelhança fisiológica nas áreas de fluxo sanguíneo coronário, crescimento do sistema cardiovascular, pulmonar e desenvolvimento neonatal (SWINDLE; SMITH, 1998).

O sistema tegumentar dos suínos assemelha-se ao do ser humano, pois sua pele é relativamente sem pêlos e tem a região epidérmica fixa e ligada firmemente ao tecido subcutâneo, assim como o fornecimento de sangue cutâneo e sequência de eventos na cicatrização de feridas (WOUK et al., 1998). A similaridade na reepitelização e metabolismo cutâneo viabiliza a utilização deste tecido suíno pelas indústrias farmacêutica e cosmética (SWINDLE; SMITH, 1998).

Embora apresente pequenas diferenças morfológicas, o fígado dos suínos tem um metabolismo semelhante ao dos humanos (SWINDLE; SMITH, 1998). Trabalhos relacionados a hemodinâmica hepática, metabolismo da glicose, lactato, lanina, e glicerol

foram desenvolvidos e validados em suínos (DROUGAS et al., 1996).

Os dados da literatura demonstram que o suíno é um modelo animal eficaz em pesquisas, podendo ser amplamente utilizado na busca do conhecimento das afecções que afetam o ser humano. A utilização desse modelo minimiza problemas éticos e a falta de material humano que se encontra ao estudar a espécie humana ou outras espécies.

O cultivo de explantes é uma técnica ainda em aprimoramento, mas eficaz em pesquisas em laboratório. Também denominado cultivo *ex vivo*, caracteriza-se pelo cultivo de fragmentos de órgãos colhidos com *punch* de biopsia ou bisturi, incubados em placas com meio de cultura em temperatura semelhante à corpórea, mimetizando as condições do organismo vivo (BANSAL et al., 2009; RANDALL et al., 2011).

Uma das maiores limitações da técnica é a viabilidade celular dos tecidos em relação ao tempo de incubação. Mesmo mimetizando as condições *in vivo* o tecido é submetido à hipóxia, assim, várias etapas do método têm sido aprimoradas, visando aumentar o tempo de incubação com preservação da viabilidade celular e morfologia do órgão. Dentre essas adaptações, pode se citar a utilização de diferentes meios de cultura, presença ou ausência de CO<sub>2</sub>, utilização de diferentes antibióticos e incubação estática ou com placas em movimento (RANDALL et al., 2011).

Apesar das limitações, a técnica permite submeter fragmentos de órgãos do mesmo doador a diversos tratamentos, além de controlar as condições ambientais às quais o tecido é submetido. Para sua realização poucos animais são necessários, uma vez que a partir de um animal são produzidos inúmeros explantes. A quantidade de explantes produzidos varia com o órgão utilizado. Órgãos como intestino permitem a produção de até 120 explantes (KOLF-CLAUW et al., 2009; RANDALL et al., 2011). As aplicações descritas para o método a partir de suínos incluem estudos de patologias ligadas aos diferentes tecidos que constituem o organismo (TROWELL, 1959), como estudos com enterites ocasionadas por bactérias (ZHU et al., 1995), substâncias cancerígenas ao sistema respiratório (MISRA et al., 1999), doenças articulares e medicamentos para seu tratamento (PEARSON et al., 2007), intoxicações por micotoxinas (KOLF-CLAUW et al., 2009) ou xenobióticos (RANDALL et al., 2011). Assim, apesar de certas limitações, a técnica é adequada para estudos toxicológicos, nutricionais e patológicos.

### 2.1.1 – Histórico do Cultivo de Explantes

A técnica de cultivo de órgãos foi inicialmente descrita em órgãos de

embriões de aves (FELL; ROBISON, 1930). O tamanho reduzido facilita a incubação do órgão inteiro, além dos tecidos embrionários apresentarem maior resistência à hipóxia. Mas Trowel (1959) cultivou tecidos provenientes de ratos adultos e comparou a viabilidade tecidual de explantes de diversos órgãos cultivados por nove dias. A conclusão foi que tecidos provenientes da traqueia, artérias e ureter apresentavam maior resistência ao tempo de cultivo. O autor constatou também que a manutenção da pressão de oxigênio e a utilização de aditivos como tiamina e outros aminoácidos ao meio de cultura melhorava a viabilidade celular, sem que ocorresse crescimento celular em diversos órgãos (ou partes deles).

Browning e Trier (1969) fizeram adaptações à técnica, adicionando nutrientes ao meio de cultura, associando a incubação em estufa a 37o C com 95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>. Assim, pela primeira vez foi possível incubar fragmentos do intestino delgado de humanos por 24 horas, e mesmo com redução na altura de vilosidades estes fragmentos mantiveram a morfologia. Esses estudos ampliaram a aplicação da técnica, possibilitando a investigação de fatores relacionados à patogênese de doenças, manutenção da homeostase intestinal, produção de enzimas e hormônios, identificação de substâncias tóxicas, proteínas maternas e seus mecanismos de ação para passagem ao feto (BASHA et al., 1979). O esclarecimento da biogênese das proteínas intestinais (DANIELSEN et al., 1983) e análise da capacidade de replicação de enterovírus (HEINZ et al., 1987) também foram realizados a partir do emprego do cultivo de explantes.

Os bons resultados observados com tecidos como intestino que são mais sensíveis à hipóxia, presente no momento do cultivo, estimulou o emprego da técnica em outras áreas da ciência como a dermatologia, objetivando elucidar os mecanismos envolvidos na re-epitelização epidérmica (HEBDA, 1988); a gastroenterologia, para analisar a adesão bacteriana e lesões ocasionadas aos enterócitos por cepas enteropatogênicas de *Escherichia coli* (ZHU et al., 1995) e a oncologia, para avaliar as lesões que substâncias carcinogênicas, como a nicotina, são capazes de ocasionar à cartilagem nasal (MISRA et al., 1999).

Em resumo, a técnica é considerada promissora também para outros ramos da ciência, mesmo com a limitação entre o tempo de incubação e a viabilidade celular. Investigações relacionadas aos efeitos de patógenos, mecanismo de ação de toxinas ou interação parasita-hospedeiro são exemplos de estudos que podem se beneficiar do modelo explante intestinal.

### 2.1.2 – Vantagens da Técnica

A técnica de cultivo de explantes se mostra vantajosa por permitir a redução no número de animais utilizados em experimentação laboratorial, uma vez que são produzidos inúmeros explantes a partir de um único doador (KOLF-CLAUW et al., 2009; RANDALL et al., 2011), permitindo ainda maior controle ambiental para experimentação *in vitro*, quando comparado com o modelo *in vivo*. A aplicação de doses definidas das substâncias de interesse diretamente no órgão alvo, comparando amostras tratadas e controles provenientes de um único doador, permite a obtenção de resultados mais fidedignos (RANDALL et al., 2011). Este método possibilita a avaliação da morfologia dos órgãos analisados (KOLF-CLAUW et al., 2009), bem como a dosagem de hormônios e mensuração da produção de proteínas (BASHA et al., 1979) e muco (LLOYD et al., 1984). Essas características tornam o método propício para pesquisas com substâncias tóxicas ou xenobióticos (KOLF-CLAUW et al., 2009; RANDALL et al., 2011) e com patógenos (ZHU et al., 1995; POUCKE et al., 2010).

Associado às vantagens da utilização da técnica, há que se considerar a questão bioética. A sociedade atual exige cada vez mais o controle no uso de animais em experimentação. Nesse sentido, o modelo de cultivo de explantes atende além dos requisitos éticos, também aos legais. A normatização (decreto 93.933 aprovado em 1987) do Conselho Nacional de Saúde determina que todo estudo deve ser planejado de maneira a obter o máximo de informações utilizando-se o menor número de animais (SCHNAIDER; SOUZA, 2003).

### 2.1.3 – Órgãos de Suínos Cultivados

#### 2.1.3.1 – Intestino

O intestino é um órgão frágil que desempenha funções vitais à homeostase corporal, portanto tem sido objeto de interesse em estudos que visam elucidar mecanismos fisiopatológicos das doenças intestinais. Os primeiros estudos utilizando fragmentos de intestino foram a partir de íleo incubados por 48 horas para averiguar a replicação de enterovirus em suínos (HEINZ et al., 1987). Outros estudos utilizando o suíno como modelo animal incubaram explantes de intestino com o objetivo de avaliar os mecanismos de adesão de *Escherichia coli* em enterócitos. Análises histológicas e ultra-estruturais foram realizadas em explantes de leitões recém-nascidos e desmamados incubados por 12 horas. A viabilidade

tecidual foi comprovada, sendo que os melhores resultados foram observados nos explantes dos animais mais jovens incubados por oito horas (ZHU et al., 1995; KOLF-CLAUW et al., 2009).

Os efeitos da contaminação por micotoxinas também foram avaliados por meio do modelo *ex vivo*, utilizando jejuno de suínos (KOLF-CLAUW et al., 2009). O modelo permitiu a análise de alterações histológicas, imunológicas e imuno-histoquímicas. A expressão de *mitogen activated kinases* que compõem vias de sinalização celular também foram analisadas neste modelo (LUCIOLI et al., 2013). Além da possibilidade de analisar os efeitos de mono-contaminações de micotoxinas, o modelo de explantes permite avaliar os efeitos da associação de diferentes patógenos, ou substâncias protetoras sobre a mucosa intestinal.

#### 2.1.3.2 – Sistema respiratório

Explantes de cartilagem nasal de suínos foram utilizados em ensaios sobre os efeitos da nicotina na produção de glicosaminoglicanos, uma vez que pouco se sabe sobre esta ação (MISRA et al., 1999). O interesse no modelo do explante de cartilagem advém da possibilidade de expor o tecido a agentes carcinogênicos como a nicotina. Nesse estudo os explantes foram incubados por seis dias, sendo possível comprovar a ação destrutiva da nicotina sobre a cartilagem e a modulação desse efeito pela interleucina 1.

Explantes de traquéia, brônquios e pulmão foram utilizados em estudos sobre os mecanismos de replicação dos vírus da influenza humana, aviária e suína. O modelo permitiu analisar a ligação dos vírus aos receptores de membrana celular, bem como a replicação viral em cultivos de 72 horas e demonstrar que os suínos não são a principal espécie para a ocorrência de recombinações gênicas (POUCKE et al., 2010).

#### 2.1.3.3 – Articulação

Os efeitos da indometina como anti-inflamatório e condroprotetor foram avaliados no cultivo de explantes de articulação em suínos (PEARSON et al., 2007). Os explantes foram colhidos de maneira asséptica com bisturi da articulação intercarpal e mantidos em meio de cultura por 144 horas. O modelo foi adequado para mimetizar a osteoartrite e comparar a modulação da indometina e de um extrato herbal sobre a resposta inflamatória na articulação.

Doenças articulares como a osteoartrite são de grande impacto na produção animal, sendo a perda de glicosaminoglicanos um evento precoce nesta afecção. A associação entre a perda de glicosaminoglicanos e a morte de condrócitos após lesão mecânica foi avaliada utilizando-se também o modelo *ex vivo* com articulações (OTSUKI et al., 2008). Explantes de 6 mm foram cultivados por 48 horas, provenientes da articulação do joelho de suínos de 6 a 9 meses de idade, após serem submetidos a uma única lesão por impacto. A viabilidade celular e a morte celular foram analisadas por exame imuno-histoquímico (Caspase 3), constatando-se que a diminuição drástica dos glicosaminoglicanos não leva diretamente ao aumento da morte celular.

O modelo *ex vivo* também permitiu importantes avanços na prevenção e cura de doenças articulares em equinos, uma vez a utilização desta espécie em experimentos laboratoriais não se mostra viável (PEARSON et al., 2007).

#### 2.1.3.4 –Endométrio

Nos suínos, a quantidade de proteína secretada pelo endométrio aumenta drasticamente durante a fase lútea do ciclo estral e no início da gestação, ocorrendo também uma mudança acentuada na composição de proteínas. Estas proteínas formam os constituintes macromoleculares do chamado “leite uterino”, responsável pela manutenção do conceito durante a gestação. Uma proteína produzida neste período e de grande importância devido a sua provável função de transporte de ferro da mãe para o feto é a proteína *purple* (BASHA et al., 1979).

Basha et al. (1979), a fim de avaliar se em curto prazo explantes de endométrio de fêmeas suínas prenhas e não prenhas são capazes de sintetizar a proteína *purple in vitro*, colheram assepticamente úteros de fêmeas suínas no terceiro dia do ciclo estral e em diferentes fases da gestação. Os explantes foram incubados por 24 horas, constatando-se que o endométrio produz e libera esta proteína nas condições de cultivo, ocorrendo declínio na produção após 60 dias de gestação. Estes resultados demonstram a necessidade da suplementação de ferro de acordo com a fase gestacional dos animais.

#### 2.1.3.5 –Pele

A similaridade entre a pele humana e suína fomentou o interesse de utilizar explantes de pele em testes de cosméticos. O modelo tem sido utilizado para a avaliação de

segurança à exposição cutânea de substâncias químicas (DAME et al., 2008), assim como a avaliação de substâncias antioxidantes solúveis em água, a fim de reduzir os efeitos ocasionados pelos raios ultravioletas à pele (MOISON et al., 2003). O uso da pele de suínos na indústria cosmética colabora no aspecto ético ao reduzir o número de animais em experimentação e evitar testes em animais de laboratório.

Este tecido, quando colhido de maneira asséptica, permite incubações por períodos de até oito dias, com a troca do meio de cultura a cada dois dias, o que permite a manutenção da viabilidade celular (DAME et al., 2008). Explantes de 3 a 6 mm podem ser produzidos com pele colhida do flanco de animais entre seis a nove meses de idade. O cultivo de pele permite ainda, após o período de incubação que estes explantes sirvam como fonte para cultivo primário de células (DAME et al., 2008; MOISON et al., 2003).

#### 2.1.4 – Conclusão

Explantes de diferentes tecidos de suínos têm sido utilizados na experimentação animal. As finalidades são tão diversas como a ciência: avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas, carcinogênicas, terapêuticas, agentes biológicos ou testes de sensibilidade.

O modelo *ex vivo* é conhecido desde a década de 30, no entanto, nos últimos anos, em decorrência de aspectos éticos e legais foi redescoberto como técnica prática e eficaz. O tempo de incubação com manutenção da viabilidade celular, dependendo do tecido, é um fator limitante desse modelo. Por outro lado, o método permite procedimentos experimentais mais controlados associado à redução no número de animais, ampliando as áreas de investigação científica.

## 2.2 – MICOTOXINAS

Fungos, mofos ou bolores, são microrganismos eucarióticos multicelulares e filamentosos que ocasionam alterações no sabor e qualidade dos alimentos. Embora algumas destas alterações sejam desejáveis para produção de alimentos, muitas espécies de fungos são denominados toxicogênicos, ou seja, produtores de toxinas. Estas toxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, denominadas micotoxinas. A presença de cepas de fungos em grãos ou alimentos indica risco potencial, no entanto somente a detecção das micotoxinas determina a toxicidade de cada gênero de fungo (DINIZ, 2002; CAST, 2003).

As micotoxinas têm características estrogênicas, mutagênicas ou teratogênicas e sua ingestão pode causar o que se conhece por micotoxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade de cada micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo (PERAICA et al., 2000; BHATNAGAR et al., 2002). A ingestão destas toxinas pode interferir negativamente no *status* imunitário do animal, e favorecer o desenvolvimento de infecções secundárias, o que agrava o quadro clínico e dificulta o diagnóstico das micotoxicoses (OSWALD; TARANU, 2008).

Os efeitos de cada micotoxina variam com a dose e a frequência da ingestão. As intoxicações podem ser agudas, geralmente associadas à ingestão de doses elevadas com rápida manifestação e percepção dos sinais clínicos, oferecendo risco à vida do indivíduo. A ingestão crônica de doses baixas de micotoxinas frequentemente não induz a sinais clínicos específicos, ocasionando no entanto, perdas econômicas significativas na produção animal (SANTÚRIO et al., 2000; SANTIN et al., 2000) e favorecendo o desenvolvimento de doenças em seres humanos (PITT, 2000; PESTKA et al., 2004; DILKIN; MALLMAM, 2011).

Dentre os diversos fungos micotoxigênicos, o gênero *Fusarium* spp. é capaz de produzir mais de 180 metabólitos secundários. Este gênero demonstra alta incidência entre as culturas de grãos no Brasil, assim como nos demais países do mundo (DILKIN; MALLMAM, 2011).

Dentre as fusariotoxinas, as fumonisinas são produzidas por várias espécies de *Fusarium*, sendo o mais comum o *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*. Existem inúmeros análogos entre as fumonisinas, sendo que apenas a fumonisina B1 (FB1), fumonisina B2 (FB2) e fumonisina B3 (FB3) ocasionam risco a saúde humana e animal. A FB1 corresponde a 70% da produção dos vários análogos das fumonisinas, enquanto a FB2 e a FB3 estão presentes na natureza em pequenas concentrações (DILKIN; MALLMAM, 2011).

Outra micotoxina de grande impacto econômico e alto risco à saúde humana é o desoxinivalenol (DON). Micotoxina compreendida no grupo dos tricotecenos, cuja maior ocorrência é no inverno devido às baixas temperaturas e umidade (DILKIN; MALLMAM, 2011). Sua importância se dá pela severidade das lesões que acarreta no organismo, pois afeta a síntese proteica e interfere na síntese de DNA e RNA, diminuindo a multiplicação e o metabolismo celular (PETSKA et al., 2004).

A FB1 e o DON atuam como contaminantes naturais que podem ser encontrados em grãos *in natura* e alimentos de origem vegetal (DILKIN; MALLMAM, 2011)

sendo comum a ocorrência de contaminação por mais de um tipo de micotoxina (HUFF; DOERR, 1981; GLAHN et al., 1988; SPEIJERS; SPEIJERS, 2004; KAWASHIMA; SOARES, 2006).

Estudos sobre a multi-contaminação por micotoxinas são escassos, particularmente os relacionados aos tricotecenos, dificultando o conhecimento sobre os efeitos da interação em diferentes espécies, faixas etárias e raças (SPEIJERS; SPEIJERS, 2004). A ingestão crônica de doses baixas de fumonisina (6 mg/kg) e DON (3 mg/kg) levou a efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos em diferentes parâmetros avaliados em leitões (GRENIER et al., 2011; BRACARENSE et al., 2012). Os efeitos da co-contaminação com ocratoxina A (5 mg/Kg) e citrinina (400 ppm) sobre a função renal foram avaliados em frangos, não sendo constatado efeito aditivo entre as micotoxinas em intoxicações agudas (GLAHN et al., 1988). Frangos de corte alimentados por três semanas com ração contendo aflatoxina (0,25 mg/g e 2 mg/g) e ocratoxina A (2 mg/g) isoladamente e em associação apresentaram nefropatia. A associação das micotoxinas induziu um efeito sinérgico nas lesões renais (HUFF; DOERR, 1981).

Um importante aspecto a ser destacado, refere-se a regulamentações sanitárias que consideram apenas os efeitos das mono-contaminações, não avaliando os possíveis efeitos aditivos/sinérgicos ou antagônicos que estas micotoxinas podem apresentar quando contaminam os alimentos simultaneamente. Deste modo, é necessário que estudos abrangendo esses aspectos sejam desenvolvidos. Para tanto, o uso de modelos *in vitro* e *ex vivo* são desejáveis como estratégia para avaliação inicial, seguida posteriormente de estudos *in vivo*.

O emprego da técnica *ex vivo* mostra um grande potencial no estudo de micotoxinas ou demais agentes tóxicos ao organismo humano e animal (BANSAL et al., 2009; KOLF-CLAUW et al., 2009; RANDALL et al., 2011).

Elucidar os mecanismos de ação destas substâncias sob o organismo animal e humano, assim como avaliar qual o tipo de interação ocorre entre as micotoxinas em casos de multi-contaminações, pode favorecer o estabelecimento de normas que regulamentem os níveis de tolerância de cada uma das micotoxinas (Anexo A) e sua associação, entretanto estudos *in vivo* são onerosos e envolvem questões bioéticas. Desse modo, a utilização de modelos alternativos que mimetizem os sistemas orgânicos de interesse é uma ferramenta extremamente interessante.

## 2.2.1 – Fumonisinias

### 2.2.1.1 – Aspectos epidemiológicos

As fumonisinas são produzidas pelo gênero *F. verticillioides* e *F. Proliferatum*, tendo sido isoladas pela primeira vez em 1988 (GELDERBLUM et al., 1988). A primeira descrição, ocorreu em 1990, em milho mofado originário da África do Sul (SYDENHAUM et al., 1990).

Dados de extensos estudos com fumonisinas indicam que uma alta proporção de milho é contaminado em todo o mundo (ABRAMSON et al., 1997). Os níveis de contaminação variam entre os diferentes continentes de acordo com as condições climáticas. Na maioria das amostras analisadas, FB1 é a micotoxinas de maior prevalência, seguida de FB2 e FB3. Os níveis de contaminação relatados em todo o mundo variam entre 0,01 a 155 mg/Kg para FB1 e 0,01 a 22,9 mg/Kg para FB2. Em relação aos percentuais de contaminação, na Argentina 92% das amostras estavam contaminadas, na África 57%, 43% na China e 34% nos Estados Unidos (OSWALD; TARANU, 2008).

No Brasil, os últimos 10 anos de pesquisa nesta área apresentam variadas taxas de contaminação de fumonisina em milho (MAZIERO; BERSOT, 2010). Amostras de milho (19) oriundas do estado de São Paulo apresentaram concentração média de fumonisinas de 5,61 mg/g (CAMARGOS et al., 2000). No estado de Pernambuco, 94,6% dentre as 74 amostras de milho avaliadas entre 1999 e 2001 estavam contaminadas, apresentando níveis entre 20 a 8600 µg/Kg (KAWASHIMA; SOARES, 2006). No Distrito Federal, de 208 amostras analisadas, 80,6% apresentavam contaminação por fumonisinas (0,127 mg/kg em cereais e 2,04 mg/kg em creme de milho) (CALDAS; SILVA, 2007).

Rações destinadas à alimentação animal apresentaram níveis de aflatoxina dentro dos limites máximos aceitáveis, variando entre não detectável a 15,60 ng/g. A contaminação por fumonisina variou entre não detectável a 11,22 µg/g, sendo que 76% das amostras apresentaram níveis menores do que 4µg/g. No entanto, a co-ocorrência de aflatoxina com fumonisina foi constatada em 23,8% das amostras, possibilitando um risco de sinergismo tóxico (HASHIMOTO et al., 2003) (Anexo A).

Considerando que o milho é uma cultura mundial com produção anual de 583 milhões de toneladas e tem grande importância como matéria-prima na cadeia produtiva de alimentos, esforços visando à garantia fitossanitária continuam sendo assunto prioritário à saúde humana e animal. Neste contexto, o conhecimento sobre as formas e vias de

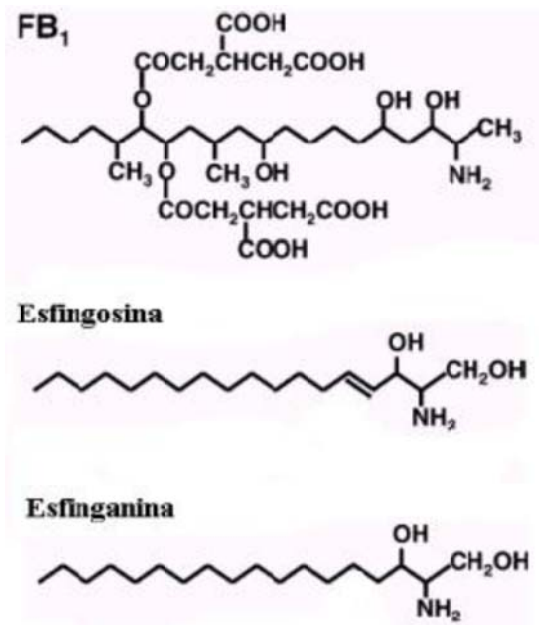
contaminação do milho, bem como sobre a produção de micotoxinas são fundamentais para direcionar as medidas preventivas (FIGUEIRA et al., 2003).

### 2.2.1.2 –Estrutura físico-química da FB1

As fumonisinas são resistentes ao calor, sendo pouco degradadas durante a fermentação ou manufatura por trituração úmida do amido de milho, uma vez que é solúvel em água (SCOTT, 1993).

A fórmula empírica da FB1,  $C_{34}H_{59}NO_{15}$ , consiste em um diester de propano-1,2,3-ácido tricarbálico e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxieicosano (BEZUIDENHOUT et al., 1988). São moléculas fortemente polares, solúveis em água e em acetronitrila-água e insolúveis em solventes orgânicos (SCOTT, 1993).

**Figura 2.2.1** –Estrutura química da fumonisina B1.



Fonte: Minami et al., (2004).

### 2.2.1.3 –Toxicologia e mecanismo de ação

Devido à maior incidência e importância da FB1, a toxicologia descrita refere-se a este análogo.

O mecanismo de ação da FB1 não é totalmente elucidado, no entanto, acredita-se que sua toxicidade está relacionada à sua semelhança estrutural às bases esfingóides. Em função dessa semelhança a FB1 se liga ao sítio catalítico da enzima ceramida

sintetase e ocasiona acúmulo das bases esfingóides; esfingosina (So) e esfinganina (Sa), com consequente depleção dos esfingolípídios. Esta ligação interfere diretamente na biossíntese dos esfingolípídios e na constituição da membrana plasmática das células (SORIANO et al., 2005; DILKIN; MALLMAM, 2011).

Os esfingolípídios são encontrados em todas as células eucarióticas (MERRIL et al., 1997). Nos mamíferos a esfinganina e esfingosina são os esfingolípídios de maior importância por atuarem em processos fisiológicos, como resposta ao estresse, proliferação e apoptose celular (OBEID et al., 1993; MERRIL et al., 2001).

A inibição da ceramida sintetase ocasionada pela ingestão da FB1, acarreta aumento dos níveis de esfinganina nas células, e algumas vezes de níveis de esfingosina (SOLFRIZZO et al., 2001), desencadeando um aumento na relação Sa:So, no sangue e urina de ratos, camundongos, coelhos e suínos. Esta elevação ocorre antes de qualquer tipo de sinal clínico, portanto, a avaliação destas bases esfingóides pode ser o indicador mais sensível de exposição às fumonisinas (WESTHUIZEN et al., 1999).

Estudos de biodisponibilidade realizados em suínos detectaram resíduos do metabolismo da FB1 em tecidos desses animais. Assim novos estudos são necessários para melhorar os métodos de detecção das bases esfingóides, para monitoramento da exposição dos animais e do homem a essas micotoxinas (POZZI et al., 2002).

#### 2.2.1.4 – Toxicidade aguda

A ingestão de FB1 pode ser fatal para alguns animais. Em equinos causa leucoencefalomalácia, caracterizada pela formação de cavitações na substância branca do cérebro, acompanhada de amolecimento da mesma, resultando em morte destes animais (PITT, 2000). Experimentalmente, a leucoencefalomalácia foi induzida em equinos, após administração via endovenosa, com dose de 0,125 mg de FB1/Kg peso vivo/dia durante nove dias (MARASAS et al., 1988).

Os suínos intoxicados por altas doses de FB1 (>20 mg/kg alimento) apresentam edema pulmonar agudo secundários a lesão endotelial, devido a adesão dos macrófagos e consequente liberação de substâncias vasoativas (SANTÚRIO et al., 2000).

#### 2.2.1.5 – Toxicidade crônica

Os sinais da intoxicação crônica da FB1 podem causar grandes perdas de

produtividade, além de serem facilmente confundidos com outras enfermidades e deficiências nutricionais (DILKIN et al., 2010). Em seres humanos, a ingestão crônica de alimentos contaminados com FB1 foi associada a câncer esofágico (WESTHUIZEN et al., 1999). Em animais ocorre letargia, perda de apetite, taquicardia e taquipnéia, após ingestão de alimentos contaminados por doses entre 1 a 20 mg/Kg de FB1 (POZZI et al., 2002; DILKIN; MALLMAM, 2011; DILKIN et al., 2004). Fêmeas gestantes podem apresentar aborto e se este não ocorrer, os leitões podem apresentar sinais de edema pulmonar (OSWEILER et al., 1992; DILKIN; MALLMAM, 2011). Estes sinais variam com a concentração da micotoxina ingerida, sexo, idade e tempo de consumo (POZZI et al., 2002).

Os índices de FB1 aceitáveis em ração animal, não estão bem estabelecidos, mas o Comitê de Micotoxinas da Associação Americana de Diagnóstico Laboratorial Veterinário (CMAADLV) recomenda níveis de até 5 µg/g para equinos e de 10 µg/g para suínos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

O cultivo celular de IPEC-1 em presença de baixas doses de FB1 (10 e 20 µM) ocasiona alterações celulares como diminuição na produção de citocinas. Em altas concentrações (50 µM) altera a passagem das células no ciclo celular na fase G0 para G1, atuando como fator predisponente ao desenvolvimento de neoplasias intestinais (BOUHET et al., 2004).

## 2.3 – DESOXINIVALENOL

### 2.3.1 – Aspectos Epidemiológicos

O DON é uma micotoxina pertencente ao grupo B dos tricotecenos, produzida pelo gênero *Fusarium graminearum* (KUSHIRO, 2008). Dentre os tricotecenos há mais de 180 micotoxinas com estrutura química semelhantes que estão presentes no meio ambiente. Estas espécies de fungos crescem em plantas e grãos, com alta incidência em grãos de trigo, e distribuição prevalente em regiões mais frias (DILKIN; MALLMAM, 2011).

A contaminação pelo DON afeta diferentes tipos de cereais. Amostras de milho, soja, trigo e destilados originários de três continentes (Europa, Ásia e América) apresentaram percentuais de contaminação entre 72 a 79% (RODRIGUES; NAEHRER, 2012).

No Brasil, a contaminação por DON ocorre principalmente no trigo e arroz. Os níveis de contaminação variam entre 25% na região sul (MALLMAN et al., 2003) e 45%

na sudeste (LAMARDO et al., 2006).

Calori-Domingues et al. (2007) avaliaram amostras de trigo nacional, comparando os índices de contaminação por DON com amostras de trigo importado (Argentina e Paraguai) e constataram altos índices da micotoxina em 94% das amostras de trigo nacional (332  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ) e em 88% das amostras de trigo importado (90  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$ ).

Outro aspecto a ser destacado é que os níveis de contaminação por DON quase sempre excedem os permitidos pela legislação (RODRIGUES; NAEHRER, 2012).

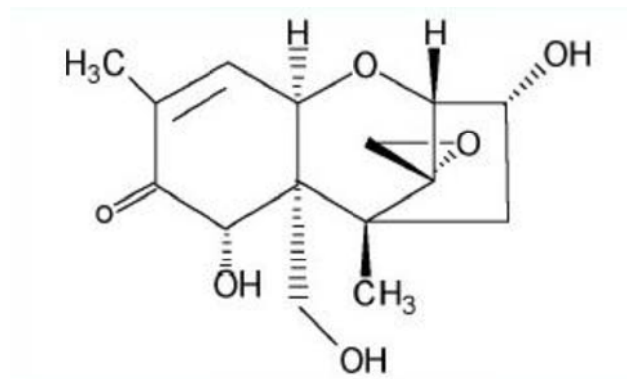
### 2.3.2 – Estrutura Físico-química

Estruturalmente os tricotecenos são micotoxinas de baixo peso molecular e apresentam um anel epóxi em C12 e C13, com dupla ligação em C9 e C18, relacionadas a toxicidade desta substância (DESJARDINS et al., 1993).

Os tricotecenos são divididos em quatro grupos, denominados A, B, C e D, de acordo com as propriedades químicas (UENO, 1977). Os fungos do gênero *Fusarium* produzem os tipos A (reconhecidos pela ausência do grupo carbonil na posição C8), no qual o DON encontra-se, e B (reconhecido pela presença do grupo carbonil na posição C8). Os grupos C e D são produzidos por outros gêneros de fungos, apresentando características químicas diferentes (UENO, 1985).

O DON, assim como as fumonisinas, não é degradado durante os processos de industrialização de alimentos, não é hidrolisado pela digestão estomacal (LAUREN; SMITH, 2001) e é solúvel em metanol, água, e etanol (UENO, 1987).

**Figura 2.3.2** – Estrutura química do desoxinivalenol.



Fonte: Oswald; Taranu, (2008).

### 2.3.3 – Toxicidade e Mecanismo de Ação

O DON é rapidamente absorvido pelo intestino, excretado na urina, sem acúmulos nos demais tecidos (PRELUSKY et al., 1988). Esta micotoxina é menos tóxica que os demais tricotecenos, no entanto, altas doses podem ocasionar morte por choque. A dose letal em camundongos é de 49 a 70 mg/kg quando administrada por via intraperitoneal (FORSELL et al., 1987). Ruminantes são mais resistentes a intoxicações por esta micotoxina (OSWALD; TARANU, 2008).

Esta micotoxina ocasiona a inibição da síntese proteica, devido a ligação à subunidade 60S dos ribossomos em células eucarióticas inibindo a peptil-transferase (FEINBERG; MCLAUGHLIN, 1989), de maneira a atuar na fase de alongamento/terminação da síntese proteica (EHRlich; DAIGLE, 1985). O estresse ribotóxico ocasionado nas células pelo DON ativa as vias de sinalização das *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) levando ao aumento do índice apoptótico (LOWELL, 2004).

A inibição proteica ocasionada pela ingestão de altas doses de DON, induz no sistema nervoso alterações do aminoácido triptofano e conseqüente alteração na síntese de serotonina (RILEY et al., 2001; PETSKA et al., 2004). A elevação dos níveis de serotonina no sistema nervoso resulta em anorexia.

Na avaliação dos efeitos de micotoxinas sob o intestino, o uso do modelo *ex vivo* permitiu inúmeros avanços, como a constatação de que o desoxinivalenol ocasiona lesões ao epitélio intestinal de maneira dose-dependentes (KOLF-CLAUW et al., 2009). O DON também interfere na permeabilidade paracelular induzindo alterações nas junções oclusivas e de adesão devido à redução na expressão de claudinas (PINTON et al., 2009).

### 2.3.4 – Toxicidade Aguda

Nos suínos, a toxicidade do DON é dose dependente. Quando ingerido em concentrações elevadas age no revestimento do trato gastrointestinal, levando a um decréscimo da função absorptiva ou de barreira física e capacidade de renovação celular no epitélio intestinal, afetando a permeabilidade paracelular e transcelular (DILKIN; MALLMAM, 2011; PINTON et al., 2010). A ingestão de altas doses (0,4 µm/L) induz, além de alterações na expressão de proteínas de junção celular, aumento no índice apoptótico devido ativação da via das MAP Kinases, com conseqüente imunossupressão (PETSKA et al., 2004; PINTON et al., 2010).

Clinicamente os animais podem apresentar desconforto abdominal, sialorréia, diarreia, êmese e anorexia (PETSKA et al., 1987; RILEY et al., 2001).

### 2.3.5 – Toxicidade crônica

A ingestão de baixas doses por longos períodos de tempo ocasiona em animais, redução do desempenho zootécnico (MINAMI et al., 2004; GOYARTS, 2006). A administração de DON nas doses de 1-2 mg/kg de ração ocasiona redução na ingestão de alimento (ROTTER et al., 1994), enquanto que 12 mg/kg desencadeia anorexia severa (YOUNG et al., 1983). Estas alterações favorecem perdas econômicas na produção pecuária e o desenvolvimento de problemas de saúde para os animais e seres humanos que consomem os produtos ou cereais contaminados (OSWALD; TARANU, 2008). Em baixas doses o DON ocasiona ainda estimulação de citocinas e quimiocinas com consequente estimulação imunológica na barreira intestinal (PETSKA et al., 2004).

Estudos em suínos mostraram que o intestino é alvo de lesões pelo DON após exposição a 10 mM/L por um período de 4 horas (KOLF-CLAUW et al., 2009). Atrofia e fusão de vilosidades são alterações mais frequentemente observadas tanto em explantes como nos experimentos *in vivo*.

## 2.4 – CONCLUSÃO

O desoxinivalenol e a fumonisina são micotoxinas de ampla distribuição que podem ser produzidas em qualquer fase do crescimento da planta ou da estocagem de grãos, e estar presentes na ração dos animais ou alimentos destinados ao consumo humano. Ambas atuam por diferentes mecanismos, mas acarretam perdas econômicas na produção animal e risco à saúde humana. Ocasionalmente ocasionam alterações importantes na permeabilidade paracelular do intestino, deixando o organismo susceptível a entrada de patógenos e desenvolvimento de doença inflamatória local. O emprego de técnicas laboratoriais como o modelo *ex vivo* permite elucidar os mecanismos de ação das micotoxinas sob o organismo e podem auxiliar na normatização de limites máximos nos alimentos, auxiliando na prevenção destas intoxicações.

## REFERÊNCIAS

- ABRAMSON, D.; MILLS, J. T.; MARQUARDT, R. R.; FROHLICH, A. A. **Canadian Journal Animal Science**. v. 49, 1997.
- BANSAL, D.; AVE, P.; KERNEIS, S.; FRILEUX, P.; BOCHE, O.; BAGLIN, A. C.; DUBOST, G.; LEGUERN, A. S.; PREVOST, M. C.; BRACHA, R.; MIRELMAN, D.; GUILLE, N. N.; LABRUYERE, E. An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 3, p. 1-11, 2009.
- BASHA, S. M. M.; BAZER, W. F.; ROBERTS, M. R. The secretion of a uterine specific, *purple phosphatase* by cultured explants of porcine endometrium dependency upon the state of pregnancy of the donor animal. **Biology of Reproduction**. v. 20, p. 431-441, 1979.
- BEZUIDENHOUT, S. C.; GELDERBLUM, W. C. A.; GORST-ALLMAN, C. P.; HORAK, R. M.; MARASAS, W. F. O.; SPITELLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**. p. 743 – 745, 1988.
- BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**. v. 81, p. 167-206, 2002.
- BOUHET, S.; HOURCADE, E.; LOISEAU, N.; FIKRY, A.; MARTINEZ, S.; ROSELLI, M.; GALTIER, P.; MENGHERI, E.; OSWALD, I. P. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier. Function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicological Sciences**. v. 77, p. 165–171, 2004.
- BRACARENSE, A. P.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; PACHECO, G. D.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**. p. 1776-1786, 2012.
- BROWNING, T. H.; TRIER, J. S. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 48, p. 1423-1432, 1969.
- CALDAS, E. D.; SILVA, A. C. S. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. **Journal of Agriculture Food Chemical**. v. 55, p. 7974–7980, 2007.
- CALORI-DOMINGUES, M. A.; ALMEIDA, R. R.; TOMIWAKA, M. M.; GALLO, C. R.; GLORIA, E. M.; DIAS, C. T. S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, p. 181-185, 2007.
- CAMARGOS, S. M.; SOARES, L. M. V.; SAWAZAKI, E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Fumonisins in corn cultivars in the State of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, p. 225-229, 2000.
- CAST, I. Mycotoxins - Risks in plant, animal and human systems, **Task Force Report**, v. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, p. 1-191, 2003.

DAME, M. K.; SPAHLINGER, D. M.; SILVA, M.; PERONE, P.; DUNSTAN, R.; VARANI, J. Establishment and characteristics of Gottingen minipig skin in organ culture and monolayer cell culture: relevance to drug safety testing. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal**. v. 44, p. 245–252, 2008.

DANIELSEN, E. M.; SJOSTROM, H.; NOREN, O. Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. **Biochemical Journal**. v. 210, p. 389-393, 1983.

DESJARDINS, A. E.; HOHN, T. M.; MCCORMICK, S. P. Tricothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics and significance. **Microbiological Reviews**. v. 57, p. 595-604, 1993.

DILKIN, P.; HASSEGAWA, R.; REIS, T. A.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**. v. 34, p. 175-191, 2004.

DILKIN, P.; DIREITO, G.; SIMAS, M. M. S.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B. Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisin B1 containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. **Chemico-Biological Interactions**. v. 185, p. 157–16, 2010.

DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Mycotoxin and mycotoxicosis in swine. Tradução de Gabriela Zaviezo M. A. **LAMIC**. 183p. 2011.

DINIZ, S. P. S. **Micotoxinas**. Livraria e Editora Rural. 181p. 2002.

DROUGAS, J. G.; BERNARD, S. E.; WRIGHT, J. K.; SIKI, M.; LOPEZ, R. R.; STOKES, K. A.; WILLIAMS, P. E.; PINSON, C. W. A model for the extended studies of hepatic hemodynamics and metabolism in swine. **Laboratory Animal Science**. v. 6, p. 648-655, 1996.

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.

FEINBERG, B.; MCLAUGHLIN, C. S. Biochemical mechanism of action of tricothecene mycotoxins. In: BEASLEY, V. R. (Ed.). **Tricothecene Mycotoxicosis: Pathophysiologic Effects**. v. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida. p. 27-35, 1989.

FELL, H. B.; ROBISON, R. **The development and phosphatase activity *in vivo* and *in vitro* of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl**. p. 1905-1921, 1930.

FIGUEIRA, E. L. Z.; COELHO, A. R.; ONO, E. Y. S.; HIROOKA, E. Y. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisinas. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 24, p. 359-378, 2003.

FORSELL, J. H.; JENSEN, R.; TAI, J. H.; WITT, M.; LIN, W. S.; PETSKA, J. J. Comparison of acute toxicities of deoxinivalenol (vomitoxin) and 15-aceyldeoxynivalenol in the B6C3F1 mouse. **Food and Chemical Toxicology**. v. 25, p. 155-162, 1987.

- GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sistema Digestivo: Tubo Digestivo. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de histologia em cores**. Tradução de Debora Milagres Pereira. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 387-416.
- GELDERBLOM, W. C.; JASKIEWWCZ, K.; MARASAS, W. F.; THIEL, P. G.; HORAK, R. M.; VLEGGAR, R.; KREK, N. P. Fumonins novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. **Applied and environmental microbiology**. v. 54, p. 1806-1811, 1988.
- GLAHN, R. P.; WIDEMAN JR, R. F.; EVANGELISTI, J. W.; HUFF, W. E. Effects of ochratoxin A alone and in combination with citrinin on kidney function of single comb White Leghorn pullets. **Poultry Science**. v. 67, p. 1034-42, 1988.
- GOYARTS, T. **Effects of the Fusarium toxin desoxinivalenol (DON) on proteins synthesis immunological parameters and DON-kinetics in the pigs**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Faculdade de Medicina Veterinária de Hannover, Hannover. 2006.
- GRENIER, B.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G. D.; COSSALTER, A. M.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. 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.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H. M.; METGES, C. C. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? **Nutrition Research Reviews**. v. 23, p. 4-22, 2010.
- HASHIMOTO, E. H.; SANTOS, M. A.; ONO, E. Y. S.; HAYASHI, C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; HIROOKA, E. Y. Bromatologia e contaminação com fumonisina e aflatoxina em rações utilizadas na piscicultura da região de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 24, p. 123-132, 2003.
- HEBDA, P. A. Stimulatory effects of transforming growth factor-beta and epidermal growth factor on epidermal cell outgrowth from porcine skin explant cultures **The Journal of Investigative Dermatology**. v. 91, p. 440-445, 1988.
- HEINZ, B. A.; CLIVER, D. O.; DONOHOE, B. Enterovirus replication in porcine ileal explants. **Journal of General Virology**. v. 68, p. 2495-2499, 1987.
- HUFF, W. E.; DOERR, J. A. Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. **Poultry Science**. v. 60, p. 550-5, 1981.
- KAWASHIMA, L. M.; SOARES, L. M. V. Incidência de fumonisina B1, aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de alimentos**. v. 26, 2006.
- KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. 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 process on the deoxinivalenol content in wheat. **Internacional Journal of Molecular Sciences**. v. 9, p. 2127-45, 2008.

LAMARDO, L. C. A.; NAVAS, S. A.; SABINO, M. Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade e São Paulo. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 65, p. 32-35, 2006.

LAUREN, D. R.; SMITH, W. A. Stability of *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking conditions. **Food Additives and Contaminants**. v. 18, p. 1011-1016, 2001.

LLOYD, C.; KENNEDY, J. R.; MENDICINO, J. Regulation of the synthesis of mucin glycoproteins in swine trachea explants. **In Vitro**. v. 20, 1984.

LOWELL, C. A. SCR-family kinases: Rheostats of immune cell signaling. **Molecular Immunology**. v. 41, p. 631-43, 2004.

LUCIOLI, J.; PINTON, P.; CALLU, P.; LAFFITTE, J.; GROSJEAN, F.; KOLF-CLAUW, M.; OSWALD, I. P.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. The food contaminant deoxynivalenol activates the *mitogen activated protein kinases* in the intestine: interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. **Toxicon**. In Press. 2013.

MALMANN, C. A.; DILKIN, M.; MÜRMAN, L.; DILKIN, P.; ALMEIDA, C. A. A. Avaliação da contaminação por desoxinivalenol em trigo utilizado na alimentação humana. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE FARMÁCIA. 1., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 2003.

MARASAS, W. F. O.; KELLERMAN, T. S.; GELDERBLUM, W. C. A. Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**. v. 55, p. 197-203, 1988.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. v. 12, p. 89-99, 2010.

MERRILL JR, A. H.; SULLARDS, M. C.; WANG, E.; VOSS, K. A.; RILEY, R. T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environmental Health Perspectives**. v. 109, p. 283- 289, 2001.

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

MISRA, R.; STEPHAN, S.; CHANDER, C. L. The ability of nicotine to induce glycosaminoglycan release in porcine nasal cartilage explant cultures. **Inflammation Research**. suppl. 2, v. 48, p. S119–S120, 1999.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize, can we reduce their occurrence. **Plant Diseases**. v. 81, p. 556-565, 1997.

OBEID, L. M. Programmed cell death induced by ceramide. **Science**. v. 259, p. 1769-1771, 1993.

OSWALD, I.; TARANU, I. **Mycotoxins in farm animals**, India. Transworld Research Network, p. 131-154, 2008.

OSWEILER, G. D.; ROSS, P. F.; WILSON, T. M.; NELSON, P. E.; WITTE, S. T.; CARSON, T. L.; RICE, L. G.; NELSON, H. A. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 4, p. 53–59, 1992.

OTSUKI, S.; BRINSON, D. C.; CREIGHTON, L.; KINOSHITA, M.; SAH, R. L.; D’LIMA, D.; LOTZ, M. The effect of glycosaminoglycan loss on chondrocyte viability. **Arthritis & Rheumatism**. v. 58, p. 1076–1085, 2008.

PEARSON, W.; ORTH, M. W.; LINDINGER, M. I. Differential anti-inflammatory and chondroprotective effects of simulated digests of indomethacin and an herbal composite (Mobility TM ) in a cartilage explant model of articular inflammation. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. v. 30, p. 523–533, 2007.

PERAICA, M.; RADIC, B.; LUCIC, A.; PAVLOVIC, M. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. **Boletim OMS**. v. 2, 2000.

PESTKA, J. J.; ZHOU, H. R.; MOON, Y.; CHUNG, Y. J. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicology Letters**. 153, p. 61–73, 2004.

PETSKA, 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.

PINTON, P.; BRAICU, C.; NOUGAYREDE, J.; LAFITTE, J.; TARANU, I.; OSWALD, I. P. 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**. p. 1956-1962, 2010.

PINTON, P.; NOUGAYRÈDE, J. P.; DEL RIO, J. C. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 237, p. 41-48, 2009.

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

POUCKE, S. G. M. V.; NICHOLLS, J. M.; NAUWYNCK, H. J.; REETH, K. V. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. **Virology Journal**. v. 7, p. 1-14, 2010.

POZZI, C. R.; ARCARO, J. R. P.; ARCARO JÚNIOR, I.; FAGUNDES, H.; CORRÊA, B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação de fumonisinas. **Ciência Rural**. v. 32, p. 901-907, 2002.

- PRELUSKY, D. B.; TRENHOLM, H. L.; SAVARD, M. E. Pharmacokinetic fate carbon-14-labeled deoxinivalenol in swine. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 1, p. 276-286, 1988.
- RANDALL, K. J.; 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.; ENONGENE, E.; VOSS, K. A.; NORRED, W. P.; MEREDITH, F. I.; SHARMA, R. P.; SPITSBERGEN, J.; WILLIAMS, D. E.; CARLSON, D. B.; MERRILL JR, A. H. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*. **Research Triangle Park**. v. 109, p. 301-308, 2001.
- 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.
- ROTTER, B. A.; THOMPSON, B. K.; LESSARD, M.; TRENHOLM, H. L.; TRYPHONAS, H. Influence of low level exposure to *Fusarium* mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine. **Fundamental and Applied Toxicology**. v. 23, p. 117-124, 1994.
- SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp na avicultura comercial. **Ciência Rural**. v. 31, p. 185-190, 2000.
- SANTÚRIO, J. M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 2, p. 1-12, 2000.
- SCHNAIDER, T. B.; SOUZA, C. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 2, p. 278-285, 2003.
- SCOTT, P. M. Fumoninsins. **International Journal of Microbiology**. v. 18, p. 257-270, 1993.
- SOLFRIZZO, M.; CARRATU, M. R.; AVANTAGGIATO, G.; GALVANO, F.; PIETRI, A.; VISCONTI, A. Ineffectiveness of activated carbon in reducing the alteration of sphingolipid metabolism in rats exposed to fumonisin-contaminated diets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 507-511, 2001.
- SORIANO, J. M.; GONZALES, L.; CATALÁ, A. I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. **Progress in Lipid Research**. v. 44, p. 345-356, 2005.
- SPEIJERS, G. J. A.; SPEIJERS, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. **Toxicology Letters**. v. 153, p. 91-98, 2004.
- SWINDLE, M. M.; SMITH, A. C. Comparative and physiology of the pig. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science**. suppl. 1, v. 25, p. 11-21, 1998.
- SYDENHUAM, E. W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; SCHALKWYK, D. J.; KOCH, K. R. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of Transkei, Southern Africa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1900-1903, 1990.

TROWELL, O. A. The culture of mature organs in a synthetic medium. **Experimental Cell Research**. v. 16, p. 118-147, 1959.

UENO, Y. The toxicology of mycotoxins. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 14, p. 99-132, 1985.

UENO, Y. Mode of action of trichothecenes. **Annales de la Nutrition et de l'alimentation**. v. 31, p. 885-900, 1977.

UENO, Y. Trichothecenes in food. In: KROGH, P. (Ed.). Mycotoxins in food. **Food Science and Technology**. Academic Press, London, p. 123-147, 1987.

WESTHUIZEN, L. V. D.; BROWN, N. L.; MARASAS, W. F. O.; SWANEVELDER, S.; SHEPARD, G. S. Sphinganine/Sphingosine ratio in plasma and urine as a possible biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. **Food and Chemical Toxicology**. v. 37, p. 1153-1158, 1999.

WOUK, A. F. P. F.; DINIZ, J. M.; CÍRIO, S. M.; SANTOS, H.; BALTAZAR, E. L.; ACCO, A. Membrana biológica (biofill) - Estudo comparativo com outros agentes promotores da cicatrização da pele em suínos: aspectos clínicos, histopatológicos e morfométricos. **Archives of Veterinary Science**. v. 1, p. 31-37, 1998.

YOUNG, L. G.; MCGIRR, L.; VALLI, V.E.; LUMSDEN, J.H.; LUN, A. Vomitoxin in corn fed to young pigs. **Journal of Animal Science**. v. 57, p. 655-664, 1983.

ZHU, H.; HAREL, J.; JACQUES, M.; FAIRBROTHER, J. M. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* 045 isolates from swine with post weaning diarrhea. **Canadian Journal of Veterinary Research**. v. 59, p. 118-123, 1995.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 – GERAL**

Padronizar a técnica de cultivo de explantes e avaliar os efeitos de fusariotoxinas em explantes intestinais de suínos.

#### **3.2 – ESPECÍFICOS**

- Determinar o melhor tempo e idade para realização do cultivo de explantes intestinais de suínos.

- Caracterizar as alterações histológicas, imuno-histoquímicas e ultra-estruturais em explantes incubados na presença de fumonisina B1 e desoxinivalenol isoladamente e concomitantemente.

## 4 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO 1

### Effect of Age on the Viability of Pig Intestinal Explants: a Histological and Ultrastructural Approach 1

Karina M. Basso<sup>1</sup>, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense<sup>1\*</sup>

**Abstract:** Intestinal explants are a useful model for toxicological and pathological studies, but the maintenance of tissue viability for longer periods of incubation remains challenging. The aim of this study was to evaluate the effect of age on the viability of intestinal explants using a histological and ultrastructural approach. Jejunal explants were obtained from 24- and 42-day-old piglets. The explants were incubated for two or four hours and were then processed for histological analysis. The explants from younger pigs showed minor histological changes, as assessed by histological and morphometrical scores. The main microscopic findings were villi atrophy and fusion. Explants from 24-day-old pigs were incubated for four hours and subjected to ultrastructural analysis to assess cell integrity. The plasma membranes, nuclei and organelles of enterocytes and goblet cells were well preserved. Adsorptive endocytosis was also observed in enterocytes. In conclusion, the data indicate that the age of the donor influences explant viability. The intestinal morphology of incubated explants from young donors was better preserved than that of explants from older piglets. These results open interesting and promising avenues for the use of intestinal explants in studies of gastrointestinal diseases.

**Keywords:** *Ex-vivo*. Gut. Organ culture. Swine. Transmission electron microscopy.

#### 4.1 – Introduction

The gastrointestinal (GI) tract is a complex organ consisting of multiple layers and cell types with different functions, such as the absorption of nutrients and the maintenance of a physical and immunological barrier against pathogens. Diseases of the GI tract represent some of the major problems in human and animal health (Menin et al., 2008), and the establishment of suitable models to investigate the morphological or pathological aspects of these diseases has attracted increasing interest.

The complexity of intestinal structures makes investigations of morphological or pathological aspects using cell culture models difficult (Randall et al., 2011). However, the use of an *ex vivo* approach, such as intestinal explants, is suitable to mimic the GI tract. In addition, studies focusing on experimental models that allow

<sup>1</sup> Laboratory of Animal Pathology, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, CP 10011, CEP 86057-970. Londrina, PR, Brazil.

\* corresponding author, telephone 55 43 33714062, fax 55 43 33714485, email:anapaula@uel.br

assessment of intestinal lesions and antigens could contribute to the knowledge of enteric diseases. Compared to *in vivo* models, cultured explants allow greater environmental control, the direct application of predefined doses onto target organs and the comparison of treated and control samples from a single donor with more reliable results (Randall et al., 2011). Furthermore, the explant model permits the preparation of large numbers of explants from a single animal, reducing the number of experimental animals needed (Kolf-Clauw et al., 2009).

The cultivation of explants has been applied both in humans (Browning and Trier 1969; Miller et al., 2005; Bansal et al., 2009) and animals, such as laboratory animals (Young et al., 2002), cattle (Baehler and Moxley, 2000), poultry (Desin et al., 2009) and swine (Zhu et al., 1995; Kolf-Clauw et al., 2009). In pigs, the explant model has been described in studies of bacterial adhesion (Zhu et al., 1995), viral replication (Poucke et al., 2010) and mycotoxin toxicity (Kolf-Clauw et al., 2009). In this context, pigs are similar to humans in terms of digestive anatomy and physiology and therefore constitute a suitable model for the study of gastrointestinal changes (Guilloteau et al., 2010; Swindle, 1998). Despite these similarities, data from intestinal porcine explants remain limited (Zhu et al., 1995, Kolf-Clauw et al., 2009).

The scarcity of studies using intestinal explants could be related to the difficulty of maintaining tissue viability. Some studies have reported an association between the age of the donor and tissue viability, which may be due to the increased resistance of young tissue to hypoxia (Trowel, 1959; Kolf-Clauw et al., 2009).

The explant model could be very useful for morphological and toxicological studies. However, few studies have focused on the histological and ultrastructural aspects of the intestinal tissue used to prepare explants. Thus, the aim of this study was to characterize these aspects in jejunal explants from 24- and 42-day-old pigs.

## 4.2 – Material and Methods

### 4.2.1 – Animals

Four weaned pigs (Landrace x Large White x Duroc), aged 24 (7.1 kg  $\pm$  0.9) and 42 (18.3 kg  $\pm$  1.7) days, were used in this study. The piglets were euthanized with an intravenous injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg of body weight). The institutional Ethics Committee for Animal Experimentation approved all animal procedures.

#### 4.2.2 – *Jejunal explant culture*

The explants were obtained from the middle jejunum. Jejunum fragments (5 cm each) Fragments with 5 cm of jejunum were collected in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 0.2 ml/L glutamine, 0.5µg/ml gentamicin and 10 ml/L penicillin/streptomycin. Four to six washes were performed with buffered saline solution. Each jejunum segment was opened longitudinally, and pieces with diameters of 8 mm were obtained with biopsy punches. Three explants/well were deposited villi upward onto agar-coated 6-well plates containing 3 ml of DMEM plus 10% fetal bovine serum, glutamine (0.2 ml/L), gentamicin (0.5 µg/ml) and penicillin/streptomycin (10 ml/L). All of these procedures were completed within 1 hour of euthanizing the piglets. The explants were incubated at 37°C with orbital shaking for 2 or 4 hours and were subsequently fixed in 10% buffered formalin for histological analysis. In all experiments, uncultured control tissue was placed into fixative solution at the end of the dissection time (0 h). All procedures were performed in triplicate.

#### 4.2.3 – *Histological and ultrastructural assays*

The samples for histological evaluation were dehydrated in alcohol and embedded in paraffin, and 5 µm-thick sections were stained with hematoxylin and eosin. Histological changes were recorded, and a tissue score representing a maximum of 22 points was established based on the occurrence and severity of changes, as previously described (Kolf-Clauw et al., 2009) with minor modifications. The following criteria were included in the histological evaluation: vacuolation of the cell cytoplasm, brush border homogeneity, and dilation of lymphatic vessels. Each score represents the average of 4-6 explants from the same animal at each incubation time. The villi heights of ten randomly selected villi were measured using a MOTIC Image Plus 2.0 ML® image analysis system.

Explants from 24-day-old piglets were also subjected to ultrastructural analysis. The samples were fixed in Karnovsky modified solution, post-fixed in 1% osmium tetroxide, and after complete sequential dehydration, were embedded in epoxy resin and maintained for 3 days at 60oC for polymerization. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and analyzed by TEM (model FEI Tecnai 12).

#### 4.2.4 Statistical analysis

The results are presented as the medians of independent variables. The scores and villi heights were analyzed by the Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's test, using the BioEstat software 5.0 (Belém, Pará, Brasil). P values  $\leq 0.05$  were considered significant.

### 4.3 – Results

#### 4.3.1 – Histological and Morphometrical Assays

We first evaluated the histological changes that occurred in the two age groups (24 and 42 days) after two or four hours of incubation. The changes were compared to explants collected soon after death (control). Control explants from 24 and 42 day-old animals showed simple columnar cells with brush borders and interspersed goblet cells lining the gut (Figure 4.3.1A; D). The intestinal villi showed normal morphology. A mild to moderate lymphocytic infiltration was observed in the lamina propria. Mild dilation of the lymphatic vessels was also observed occasionally.

In incubated explants from 24-day-old piglets, the main changes were vacuolar degeneration of enterocytes and villi atrophy (Figure 4.3.1B; C). These changes increased from mild (2 h) to moderate severity (4 h). After four hours of incubation, mild villi fusion was also observed (Figure 4.3.1C). A significant decrease ( $p \leq 0.05$ ) in the tissue score of the explants from the 24-day-old group was verified at both time points (19% reduction after 2 h and 33.3% reduction after 4 h), compared to the control group (Figure 4.3.2A).

After two hours of incubation, explants from the 42-day-old pigs displayed villi fusion and atrophy, with mild flattening and focal loss of apical enterocytes (Figure 4.3.1E). Similar changes were observed after four hours of incubation. In these explants, the tissue score decreased by 44.4% ( $p \leq 0.05$ ) after two hours and by 38.8% ( $p \leq 0.05$ ) after four hours of incubation, in comparison with the control group (Figure 4.3.2A).

Villus height morphometry was performed to evaluate the maintenance of tissue morphology. The median villi heights in the control explants from 24- and 42-day-old pigs were 248.4  $\mu\text{m}$  and 240.24  $\mu\text{m}$ , respectively. Compared to non-incubated samples, a significant decrease in villi height was observed after two (29.6%) and four (35.7%) hours of incubation in the explants from 24-day-old piglets. The explants from 42-day-old pigs showed

a significant reduction (53.9%) only after four hours of incubation (Figure 4.3.2B).

The histological scores and morphometrical measures were also compared between the age groups analyzed (24 and 42 days). The explants from 42-day-old pigs showed significantly lower jejunal scores than the explants from 24-day-old piglets at all-time points (0, 2 and 4 hours) (Figure 4.3.2A). The villi height was similar in the explants from both age groups at 0 and 2 hours of incubation. However, after 4 hours of incubation, the villi height from the 42-day-old pigs was significantly reduced (30.6%) (Figure 4.3.2B).

#### 4.3.2 – *Ultrastructural analysis*

Ultrastructural analysis was performed to evaluate the tissue and cell integrity after incubation. We decided to use the samples with better histological preservation (from 24-day-old donors) from the 4-hour incubation group.

The morphologies of the enterocytes, the cell membrane and the nuclear membrane were preserved. A continuous monolayer of enterocytes was observed lining the gut (Figure 4.3.3A), and the apical membrane formed numerous short microvilli (Figure 4.3.3B). Intercellular junctions and desmosomes in the apical region appeared between adjacent intestinal cells. The cell cytoplasm was rich in free ribosomes and glycogen granules. Endocytic vesicles were also observed in the apical cytoplasm (Figure 4.3.3 C). Mitochondria were observed as elongated ovoid structures consisting of double electron-dense lines and a series of invaginations into the organelle, which generate the mitochondrial cristae. The nuclei contained a low concentration of heterochromatin and large, distinct nucleoli. Goblet cells containing numerous secretory granules in the apical region were also observed.

#### 4.4 – **Discussion**

Efforts to reduce the number of experimental animals have led to the development of new models laboratories. The explant model provides a system for evaluating numerous biological questions however, it is limited by the short duration of tissue viability. Explants from the ureter, trachea and arteries can be maintained for periods of up to nine days (Trowell, 1959), but the viability of intestinal explants is relatively limited (Bansal et al., 2009, Kolf-Clauw et al., 2009). In this study, we observed that the age of the donor influenced the tissue viability. Non-incubated explants from 24-day-old animals presented an average histological score of 21 points, while explants from 42-day-old animals presented an average

histological score of 18 points. Incubated explants were observed to have significantly lower scores than non-incubated explants, independent of the incubation time. This decrease was more pronounced in older pigs. Other studies have compared tissues from embryos or weaning animals with those of older animals and have reported similar results (Trowel, 1959, Kolf-Clauw et al., 2009). Studies comparing tissue changes in young/mature and old rats have also shown that cell regeneration and tissue integrity under normal and hypoxic conditions are better in young animals than in older ones (Gunther and Kranz, 1981, Stupina et al., 1989). One hypothesis to explain this difference is that increasing age is accompanied by a decreased ability to adapt to conditions such as hypoxia (Trowel, 1959, Stupina et al., 1989).

We were also interested in evaluating the maximal incubation duration that preserves intestinal morphology and function. We verified that after six and eight hours of incubation, the histological changes characteristic of autolysis occurred in almost all of the explants (data not shown). However, the intestinal morphology of the explants from 24-day-old piglets was preserved following incubation for two and four hours. On the other hand, after 4 hours of incubation, the histological score was 21.5% lower in samples from 42-day-old piglets than in samples from 24-day-old piglets. Villi atrophy and occasional villi fusion were the main microscopic findings after incubation. These findings are related to the hypoxic conditions that the explants experienced during the experiment. Time-dependent histological changes have also been reported in explants incubated for 4 to 8 hours (Kolf-Clauw et al., 2009). Moreover, when explants from newborn piglets were used, incubation periods of up to 12 hours were possible (Girard et al., 2005).

Ultrastructural analysis was performed to evaluate the tissue viability and function in incubated explants from 24-day-old piglets. As normal metabolism is necessary for morphological preservation, structural integrity reflects tissue homeostasis. Cell viability was confirmed by the presence of preserved cytoplasmic and nuclear membranes and subcellular structures (microvilli, cell junctions, and mitochondria). The presence of adsorptive endocytosis in enterocytes and secretory vacuoles in goblet cells confirmed the maintenance of cell function after four hours of incubation.

Intestinal explants are more feasible than inoculations in animals, which are expensive to maintain, are time consuming to study, and require specific facilities; however, although the period of explant incubation limits the applicability of this technique. Here, it was possible to obtain morphological and functional viability of the intestine when the tissue was obtained from 24-day-old animals and an incubation period of 4 hours was used. Several factors can contribute to the maintenance of intestinal explant viability during incubation. Our

results demonstrated that the age of the donor is related to the resistance of the tissue to hypoxia. Other factors, such as additives in the culture medium, the temperature, and oxygen levels, can increase tissue viability and therefore improve the utility of explants in toxicological, nutritional or pathological studies.

#### 4.5 – Acknowledgements

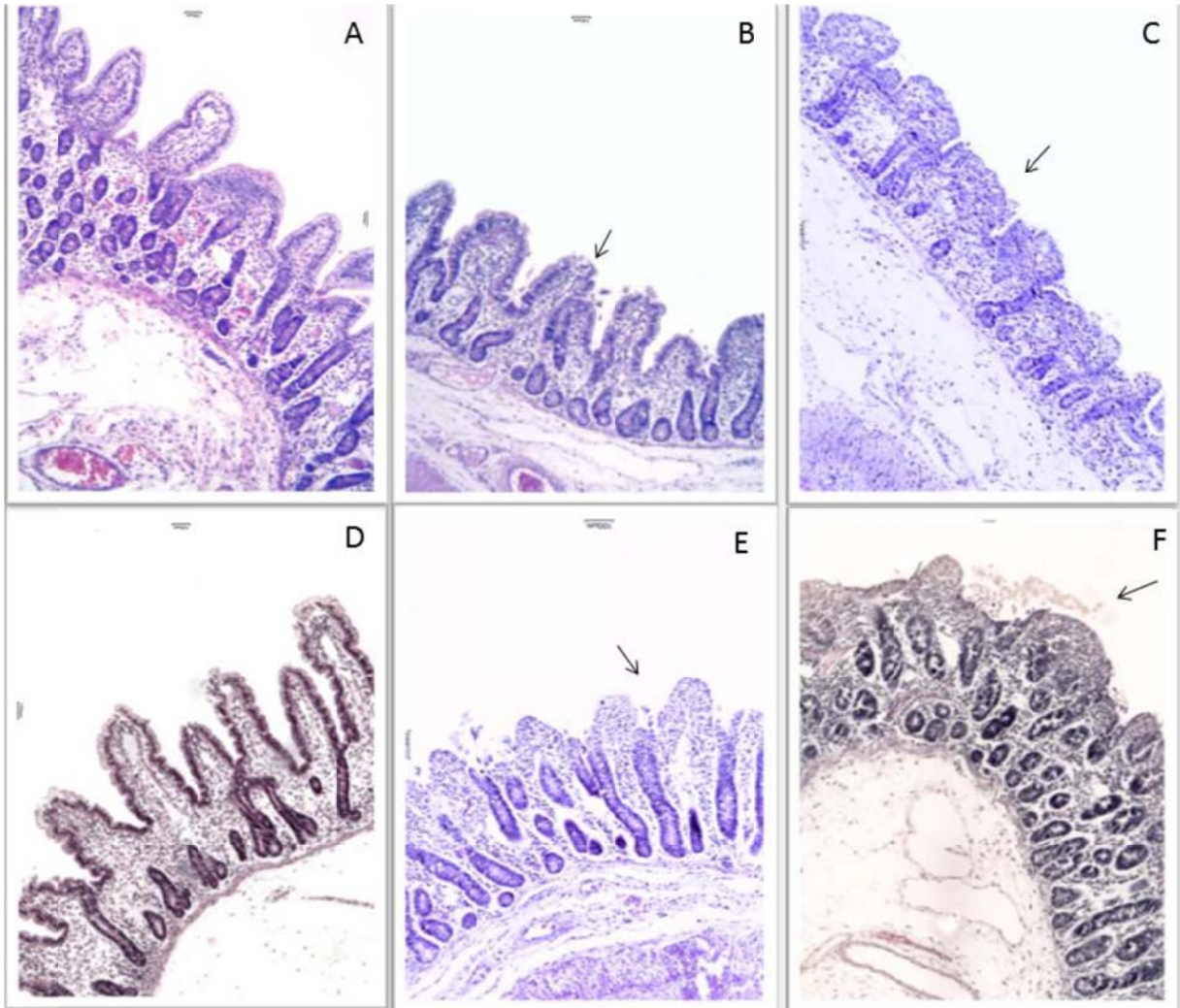
This work was financially supported by CNPq grant (474583/2010-4). K. Basso and A.P. Loureiro Bracarense are recipients of CNPq fellowship.

#### References

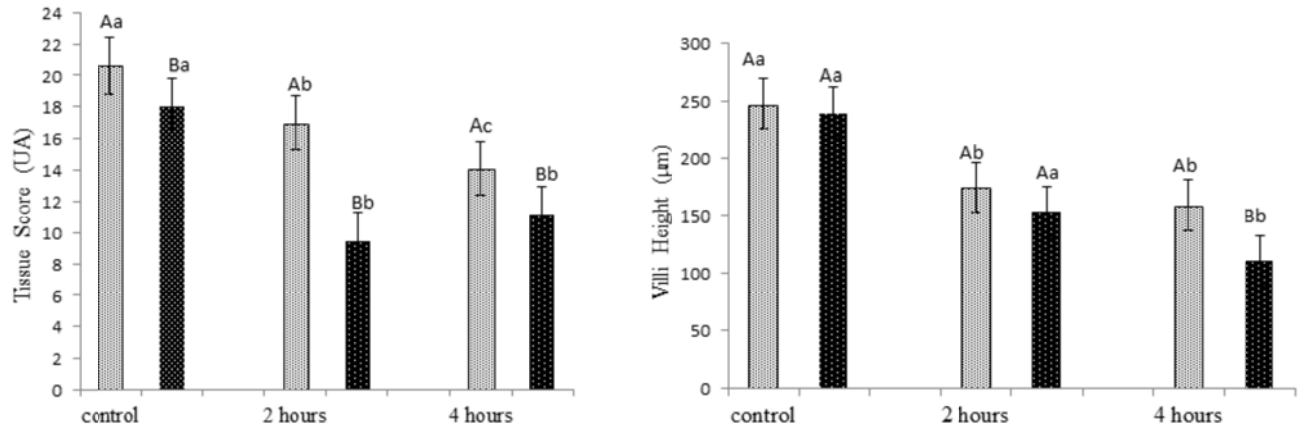
- Baehler, A.A., Moxley, R.A., 2000. *Escherichia coli* O157:H7 induces attaching-effacing lesions in large intestinal mucosal explants from adult cattle. FEMS Microbiology Letters 185, 239-42.
- Bansal, D., Ave, P., Kerneis, S., Frileux, P., Boche', O., Baglin, A.C., Dubost, G., Leguern, A.S., Prevost, M.C., Bracha, R., Mirelman, D., Guille', N.N., Labruyere, E., 2009. An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. PLOS Neglected Tropical Diseases 3, e551.
- Browning, T.H., Trier, J.S., 1969. Organ culture of mucosal biopsies of human small intestine. The journal of clinical investigation 48, 1423-32.
- Desin, T.S., Lam, P.S., Koch, B., Mickael, C., Berberov, E., Wisner, A.L.S., Townsend, H.G.G., Potter, A.A., Koster, W., 2009. *Salmonella* enterica serovar enteritidis pathogenicity island 1 is not essential for, but facilitates rapid systemic spread in chickens. Infection and Immunity 7, 2866-75.
- Girard, F., Batisson, I., Frankel, G.M., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2005. Interaction of enteropathogenic and shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and tir in adherence. Infection and Immunity 9, 6005–6016.
- Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H.M., Metges, C.C., 2010. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man?. Nutrition Research Reviews 23, 4–22.
- Günther, K., Kranz, D., 1981. Experimental autoradiographic study on the proliferation kinetics of the ischemically injured rat small intestine. Zeitschrift für experimentelle Chirurgie 14, 349-356.

- Kolf-Clauw, M., Castellote, J., Joly, B., Bourges-Abella, N., Raymond-Letron, I., Pinton, P., Oswald, I.P., 2009. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. *Toxicology in Vitro* 23, 1580–1584.
- Menin, A., Reck, C., Souza, D., Eliana, C.K., 2008. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. *Ciência Rural* 6, 1687-1693.
- Miller, R.K., Genbacev, O., Turner, M.A.A., Aplin, J.D., Caniggia, I., Huppertz, B., 2005. Human placental explants in culture: approaches and assessments. *Placenta* 26, 439- 48.
- Poucke, S.G.M.V., Nicholls, J.M., Nauwynck, H.J., Reeth, K.V., 2010. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virology Journal* 38, 1-14.
- Randall, K.J., Turton, J., Foster, J.R., 2011. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biology and Toxicology* 27, 267-84.
- Swindle M.M., 1998. Swine in the laboratory: surgery, anesthesia, imaging, and experimental techniques. second ed. CRC Press, London New York.
- Stupina, A.S., Kvitnitskaia-Ryzhova, Tiu., Mezhiborskaia, N.A., Terman, A.K., Berezhkov, N.V., 1989. Age-related ultrastructural characteristics of various cells in acute hypoxia. *Arkives Anatomi Gistologii Embriologii* 97, 25-31.
- Trowell, O.A., 1959. The culture of mature organs in a synthetic medium. *Experimental Cell Research* 16, 118-47.
- Young, S.L., Evans, K., Eu, J.P., 2002. Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants. *American Journal Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology* 282, 379–85.
- Zhu, H., Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1995. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* 045 isolates from swine with post weaning diarrhea. *Canadian Journal of Veterinary Research* 59,118-23.

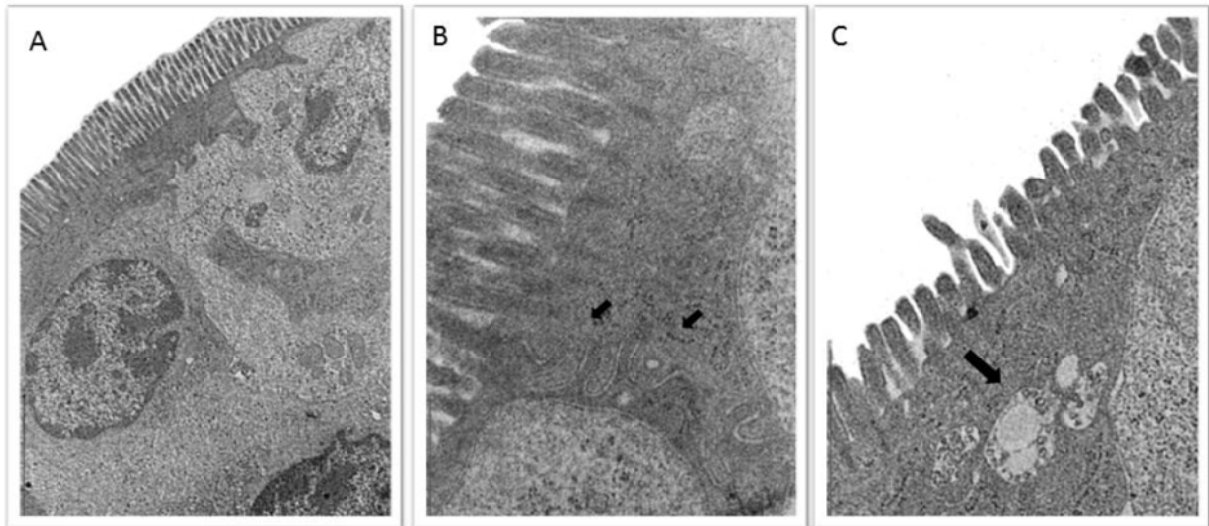
**Figure 4.3.1** –Jejunal explants from piglets with 24 and 42 days old. A to C – 24 days old pigs and D to F – 42 days old pigs. (A) and (D) Non-incubated explants showing normal villi; (B) Explant after 2 hours of incubation. Mild villi atrophy (arrow); (C) Explant after 4 hours of incubation. Mild villi atrophy and fusion (arrow); (E) Explant after 2 hours of incubation. Mild villi atrophy and focal loss of apical enterocytes (arrow); (F) Explant after 4 hours of incubation. Severe atrophy and villi fusion, loss of apical enterocytes, and cellular debris (arrow) (H.E. Objective 10x).



**Figure 4.3.2** –(A) Tissue score in jejunal explants from piglets with 24 and 42 days old in different times of incubation. (B) Median villi height ( $\mu\text{m}$ ) in jejunal explants from piglets with 24 and 42 days old. ▨ Piglets with 24 days old. ▩ Piglets with 42 days old. Different capital letters mean significant difference between ages. Different lower cases mean significant difference between control and incubated explants. ( $p \leq 0.05$ , Kruskal-Wallis Test). AU - arbitrary units.



**Figure 4.3.3** –Jejunal explants from piglets with 24 days old. Electron micrographs of explants after 4 hours of incubation. (A) Enterocyte monolayer lining the gut (Bar  $2 \mu\text{m}$ ). (B) Microvilli in the apical membrane of enterocytes (Bar  $500 \text{ nm}$ ) (C) Endocytic vesicle in the apical cytoplasm (Bar  $500 \text{ nm}$ ).



## 5 MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO 2

### **Efeitos de Fusariotoxinas em Explantes Intestinais de Suínos: Avaliação Histológica, Imuno-Histoquímica Ultraestrutural**

**Resumo:** As micotoxinas são metabólitos secundários que atuam como contaminantes naturais dos alimentos. Fusariotoxinas como fumonisina B1 (FB1) e desoxinivalenol (DON) provocam efeitos deletérios no intestino de suínos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da exposição dessas micotoxinas isoladamente e em associação sobre explantes de jejuno de leitões. Para tanto foram utilizadas análises histológicas, imuno-histoquímicas e ultra-estruturais. Cinco suínos de 24 dias foram utilizados para a colheita de explantes que foram incubados por 4 horas em meio de cultura sem micotoxinas e meio contendo Fumonisina B1 (100  $\mu$ M), desoxinivalenol (10  $\mu$ M) e ambas as micotoxinas (100  $\mu$ M+10  $\mu$ M). A exposição às micotoxinas induziu a um aumento significativo de alterações morfológicas, sendo mais severo no grupo exposto ao desoxinivalenol e desoxinivalenol+fumonisina B1. Redução significativa na altura de vilosidades ocorreu nos grupos tratados com desoxinivalenol e desoxinivalenol+fumonisina B1. Redução na expressão de E-caderina foi observada nos explantes tratados com fumonisina B1 e desoxinivalenol. Alterações das estruturas juncionais ocorreu nos grupos tratados com fumonisina e desoxinivalenol levando ao descolamento de enterócitos e aumento da permeabilidade paracelular. O modelo *ex vivo* foi adequado para avaliar a toxicidade intestinal induzida pela exposição isolada ou associada de fusariotoxinas.

**Palavras-chave:** Intestino. Junções celulares. Micotoxinas. Permeabilidade celular. Suínos.

**Abstract:** Mycotoxins are secondary metabolites that act as natural contaminants. Fusariotoxins as fumonisin B1 (FB1) and deoxynivalenol (DON) cause deleterious effects in the intestine of pigs. The aim of this study was to evaluate the effect of exposure of these mycotoxins alone and in combination on jejunal explants from piglets. We used histological, immunohistochemical and ultrastructural assays. Five pigs with 24 days old were used for sampling the explants. Explants were incubated for 4 hours in culture medium and medium containing fumonisin B1 (100 mM), deoxynivalenol (10 mM) and both mycotoxins (100 mM plus 10 mM). Exposure to mycotoxins induced a significant increase in morphological changes, that was more severe in the group exposed to deoxynivalenol. Significant reduction in villus height occurred in groups treated with deoxynivalenol and deoxynivalenol plus fumonisin B1. The association of toxins caused changes similar to treatment with deoxynivalenol. Absence of junctional structures occurred in groups treated with fumonisin B1 and deoxynivalenol leading to detachment of enterocytes and increase paracellular permeability. The *ex vivo* model was adequate for assessing intestinal toxicity induced by exposure of isolated or associated fusariotoxins.

**Key-words:** Cell permeability. Gut. Junctions cells. Mycotoxin. Swine.

### 5.1 – Introdução

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por diversos

gêneros de fungos. Atuam como contaminantes naturais e são comumente encontrados em grãos *in natura* e alimentos de origem vegetal. Estima-se que 25% dos grãos estejam contaminados com essas substâncias (CAST, 2003).

A fumonisina B1 (FB1) corresponde a 70% das fumonisinas produzidas pelo fungo *Fusarium verticillioides* (DILKIN et al., 2010). A toxicidade de FB1 foi comprovada em várias espécies animais, ocasionando diferentes efeitos como edema pulmonar agudo em suínos, leucoencefalomalácia em equinos, câncer hepático em ratos e câncer esofágico em seres humanos (MINAMI et al., 2004).

Dados sobre os mecanismos de ação da FB1 no sistema digestório são escassos, sendo as vias de ação sobre o epitélio intestinal pouco compreendidas. A exposição à FB1 induz redução no número de células devido à diminuição na proliferação celular e aumento no índice apoptótico, bem como diminuição na resistência elétrica transepitelial, indicando alterações na integridade do tecido (BOUHET et al., 2004).

Estudos *in vivo* demonstraram que a ingestão crônica e aguda de ração contaminada por fumonisina (6 mg/kg e 2,8 µmol/kg/PV/dia, respectivamente) levou a aumento significativo de lesões intestinais como atrofia e fusão de vilosidades e diminuição na expressão de E-caderina em leitões (BRACARENSE et al., 2012), bem como lesões hepáticas (GRENIER et al., 2011). Leitões expostos a essa micotoxina apresentaram maior translocação bacteriana para diversos órgãos (OSWALD et al., 2003), favorecendo a proliferação de bactérias oportunistas no intestino (OSWALD; TARANU, 2008).

Dentre as fusariotoxinas, o desoxinivalenol (DON), assim como a FB1, também pode contaminar grãos de milho e trigo, sendo um risco para a saúde animal e humana (PESTKA et al., 2004). A exposição de explantes ao DON causa alterações intestinais de modo dose-dependente, como achatamento dos enterócitos, fusão e atrofia das vilosidades e aumento no índice apoptótico (KOLF-CLAUW et al., 2009). Um dos efeitos dessa micotoxina é a redução na expressão de proteínas de junção celular como claudina-4 (PINTON et al., 2009; 2010) e E-caderina (BRACARENSE et al., 2012) que alteram a permeabilidade paracelular e transcelular e favorecem a penetração de patógenos (BUNNER; MORRIS, 1988).

A avaliação ultraestrutural pode auxiliar no entendimento da fisiopatologia de lesões, no entanto, estudos a respeito dos efeitos de micotoxinas sobre a ultraestrutura intestinal são escassos (WITLOC et al., 1977; OBREMSKI et al., 2005). Não há dados na literatura sobre alterações ultraestruturais induzidas pela exposição do intestino as fumonisinas e desoxinivalenol.

A multi-contaminação micotóxica é um fenômeno frequentemente observado nas contaminações naturais (GRENIER et al., 2011). No entanto, as regulamentações sanitárias consideram apenas os efeitos das mono-contaminações. Os dados disponíveis na literatura indicam que a ingestão simultânea de FB1 e DON induz um efeito aditivo e imunossupressor em comparação com a exposição a uma única toxina (GRENIER et al., 2011; BRACARENSE et al., 2012). A necessidade de mais investigações sobre os efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos nas multi-contaminações é premente, entretanto, estudos *in vivo* são onerosos e envolvem questões bioéticas. Desse modo, a utilização de modelos alternativos que mimetizam os sistemas orgânicos de interesse é uma ferramenta extremamente interessante.

A eficácia do modelo *ex vivo* para a avaliação dos efeitos da exposição ao DON sobre o intestino foi comprovada em estudos prévios (KOLF-CLAUW et al., 2009; LUCIOLI et al., 2013). O modelo foi adequado também para analisar a expressão de proteínas de junção de enterócitos (LUCIOLI et al., 2013). Considerando a necessidade de ampliar os conhecimentos sobre os resultados de interações entre múltiplas micotoxinas e os poucos dados disponíveis, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da exposição à FB1 e ao DON isoladamente e em associação utilizando o modelo de explantes intestinais.

## 5.2 Material e Métodos

### 5.2.1 – Animais

Foram utilizados cinco leitões de 24 dias de idade (6.3 kg,  $\pm 0.8$ ) para colheita dos explantes. Os animais foram desmamados aos 21 dias de idade, sendo então submetidos à dieta padrão pós-desmame em baias separadas. Aos 24 dias estes animais foram submetidos à eutanásia após sedação com acepromazina 1% (0,1ml/10Kg/IM), seguida de pentobarbital sódico (2,5mg/Kg/IV) e administração de cloreto de potássio 15% (2 ml/Kg/IV).

### 5.2.2 – Cultura de explantes e exposição a FB1 e DON

O jejuno foi escolhido para colheita de explantes porque em estudos prévios esta região foi a que se mostrou mais sensível aos efeitos das micotoxinas (PINTON et al., 2009).

Fragmentos de 5 cm do jejuno medial foram colhidos imediatamente após a eutanásia, sendo lavados com solução salina tamponada (PBS) e abertos longitudinalmente. Os explantes foram colhidos com auxílio de *punch* para biópsia (8 mm) e depositados em placas de seis poços (EasyPath), preenchidos com 3 ml de ágar-ágar e contendo meio DMEM acrescido de soro fetal bovino (10%), glutamina (0,2ml/L), gentamicina (0,50µg/ml) e penicilina/estreptomicina (10ml/L). Os explantes foram depositados com a mucosa voltada para cima (3 explantes/poço) e incubados em estufa a 37o C.

Os explantes foram incubados na presença de FB1(Cayman Company) (100 µM) ou DON (Sigma-Aldrich) (10 µM) isoladamente e FB1(100 µM) acrescido de DON (10 µM) durante quatro horas. Para cada tratamento foram incubados três explantes imersos em meio de cultura sem as micotoxinas (grupo controle). Os procedimentos experimentais foram realizados em triplicata.

### 5.2.3 – *Análise histológica e morfométrica*

Após o período de incubação os explantes foram fixados em solução de formalina a 10%, desidratados em soluções crescentes de álcoois e embebidos em parafina. Cortes de 5µm foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE) para análise histológica. As alterações histológicas foram avaliadas utilizando escore tecidual (adaptado de KOLF-CLAUW et al., 2009) (Apêndice A) em que a intensidade e a severidade da lesão foram consideradas. O escore máximo (22 pontos) indica a integridade total do intestino. Os critérios utilizados para determinação do escore foram morfologia e número de vilosidades, morfologia de enterócitos e microvilosidades, presença de debris celulares, edema intersticial, dilatação linfática e necrose celular.

Para avaliação da densidade de células caliciformes, os cortes foram corados pela técnica de alcian-blue pH 2,5 (mucinas ácidas não sulfatadas). O número de células caliciformes foi contado aleatoriamente em 10 vilosidades na região compreendida entre o ápice e a base, utilizando objetiva de 10x. Células caliciformes presentes nas criptas não foram contadas.

Para avaliação morfométrica foram mensuradas as alturas de 10 vilosidades aleatórias por explante, coradas em HE, com o auxílio do programa MOTIC IMAGE PLUS 2.0, utilizando objetiva de 10x.

#### 5.2.4 – *Análise imuno-histoquímica*

A expressão da E-caderina foi avaliada utilizando-se anticorpo monoclonal específico (clone 4A2C7, Zymed, Carlsbad, CA), sendo classificada de acordo com a intensidade e homogeneidade da marcação imunoistoquímica em forte e homogênea ou fraca e heterogênea. Os resultados foram expressos em percentual de marcação forte e homogênea. Para tanto, os cortes histológicos dos explantes foram distendidos sobre lâminas histológicas previamente silanizadas. Após a desparafinização, as lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6,0) em forno micro-ondas durante 15 minutos e bloqueio da peroxidase endógena em solução de água oxigenada e metanol (1:7), sendo então incubadas com anticorpo monoclonal anti-E-caderina (1:50) durante 18 horas em câmara úmida a 4°C. Posteriormente, as lâminas foram tratadas pelo método do polímero (Envision, Dako, Carpinteria, CA) durante 10 minutos à temperatura ambiente, sendo a reação revelada em solução de 3,3 diaminobenzidina. Os cortes foram então submetidos à contra-coloração com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula e resina sintética. Todas as reações foram acompanhadas com controle negativo e positivo da reação de acordo com o fabricante. Análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico Leica DMLS com sistema e imagem MOTIC PLUS 2.0.

#### 5.2.5 – *Análise ultraestrutural*

Os explantes controles e os tratados com FB1 e DON isoladamente foram submetidos à microscopia eletrônica de transmissão. Após o período de incubação os explantes foram fixados em solução de Karnovsky. Posteriormente, foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, sendo então tratados com acetato de uranila a 0,5% durante 18 horas em geladeira, desidratados em álcool e acetona e incluídos em resina. Destes blocos foram obtidos cortes semi-finos (2µm) em ultra-microtômo que foram corados pelo azul de toluidina. A partir destes cortes foram selecionadas áreas representativas para observação ultra-estrutural. Os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila a 2% e citrato de chumbo, durante 10 minutos cada e posteriormente lavados com água destilada, sendo então colocados sobre grades metálicas apropriadas e observados em microscópio de transmissão (FEI Tecnai 12).

### 5.2.6 – *Análise estatística*

Os dados de escore tecidual e altura de vilosidades foram avaliados por meio de análise exploratória, e as médias então submetidas ao teste de Tukey (BioEstat software 5.0. Belém, Pará, Brasil). Os dados da expressão de E-caderina foram submetidos ao teste Exato de Fisher. Considerou-se um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

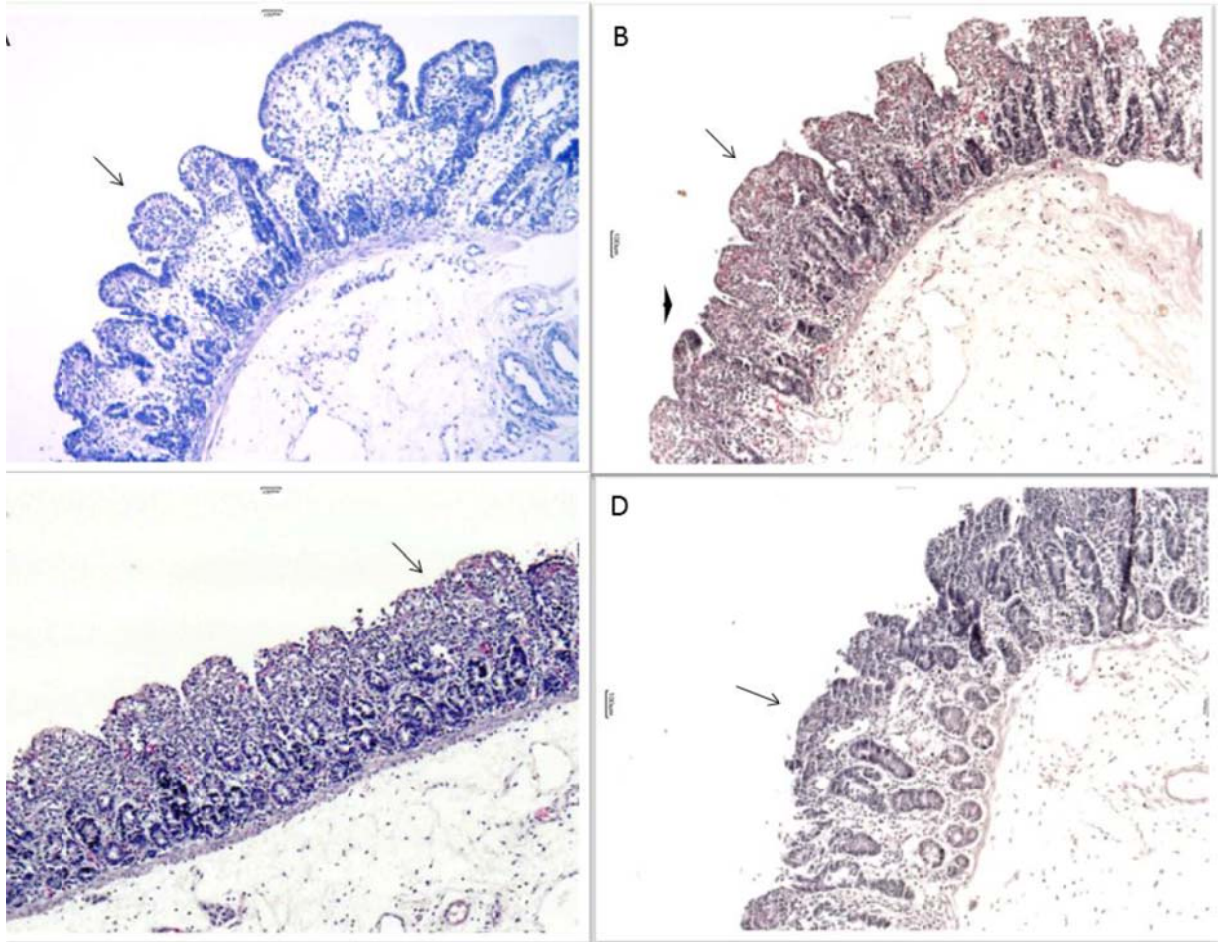
Para avaliação da densidade de células caliciformes os dados foram submetidos ao Teste Kruskal-Wallis (Bioestat 5.0 software 5.0. Belém, Pará, Brasil). Considerou-se um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.3 – **Resultados**

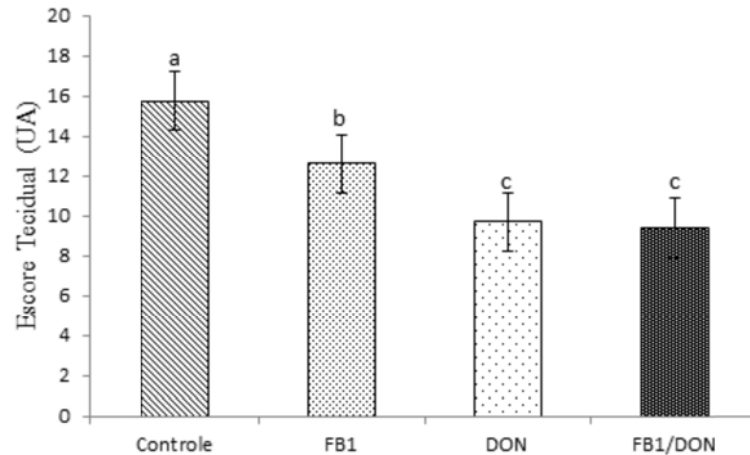
### 5.3.1 – *Análise histológica*

As principais alterações histológicas observadas no grupo controle (0 hora) foram desnudamento apical, degeneração celular e atrofia leve das vilosidades (Figura 5.3.1 A). Nos explantes expostos a FB1 observou-se desnudamento apical, fusão moderada e atrofia severa das vilosidades (Figura 5.3.1 B). No grupo tratado com DON, além das alterações observadas no grupo exposto a FB1, foram constatadas alterações na morfologia dos enterócitos e redução no número de vilosidades (Figura 5.3.1 C). As principais alterações histológicas observadas no grupo exposto a ambas as micotoxinas foram achatamento do epitélio intestinal, atrofia e fusão das vilosidades severa com consequente redução no número de vilosidades (Figura 5.3.1 D). Diminuição significativa no escore histológico foi verificada em todos os explantes tratados com micotoxinas. Em relação ao controle a redução foi de 18,8%, 37% e 37,5% para a exposição à FB1, DON e FB1+DON, respectivamente.

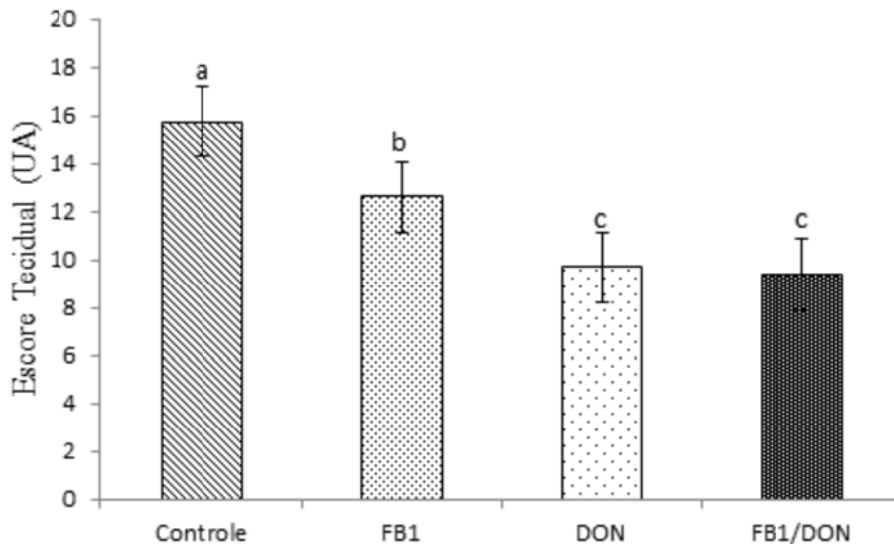
**Figura 5.3.1** –Explantes de jejuno de suíno. (A) Controle. Edema de lâmina própria, discreta atrofia de vilosidades (seta) (H.E Barra 100  $\mu$ m) (B) FB1. Desnudamento apical (cabeça seta), fusão moderada (seta) e atrofia severa das vilosidades (H.E Barra 100  $\mu$ m) (C) DON. Desnudamento apical severo, fusão e atrofia severa (seta) (H.E Barra 100  $\mu$ m) (D) FB1 +DON. Achatamento do epitélio intestinal, atrofia e fusão das vilosidades (seta) (H.E Barra 100  $\mu$ m).



**Figura 5.3.2** – Escores teciduais (média  $\pm$  desvio-padrão) de explantes intestinais de suínos expostos a fumonisina, desoxinivalenol e ambas as micotoxinas. Letras diferentes mostram diferença significativa entre os tratamentos (Teste de Tukey  $p \leq 0,05$ ). UA=unidades arbitrárias.

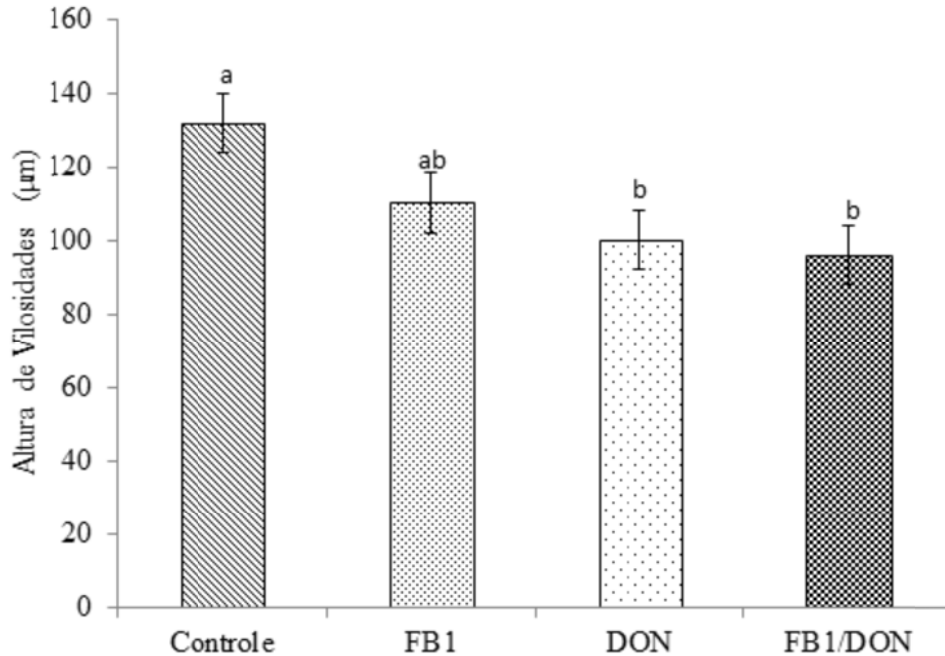


**Figura 5.3.3** –Número de células calciformes por vilosidade (média  $\pm$  desvio padrão) de explantes intestinais de suínos tratados com FB1, DON e FB1 +DON. Letras diferentes mostram diferença significativa entre os tratamentos. ( $p \leq 0.05$  Teste Kruskal Wallis).



A análise morfométrica evidenciou diminuição significativa na altura de vilosidades nos explantes tratados com DON e FB1+DON ( $p \leq 0,05$ ) em comparação ao grupo controle (Figura 5.3.4).

**Figura 5.3.4** –Altura de vilosidades (média  $\pm$  desvio padrão) em explantes intestinais de suínos tratados com FB1, DON e FB1+DON. Letras diferentes mostram diferença significativa entre os tratamentos (Teste Tukey,  $p \leq 0,05$ ).

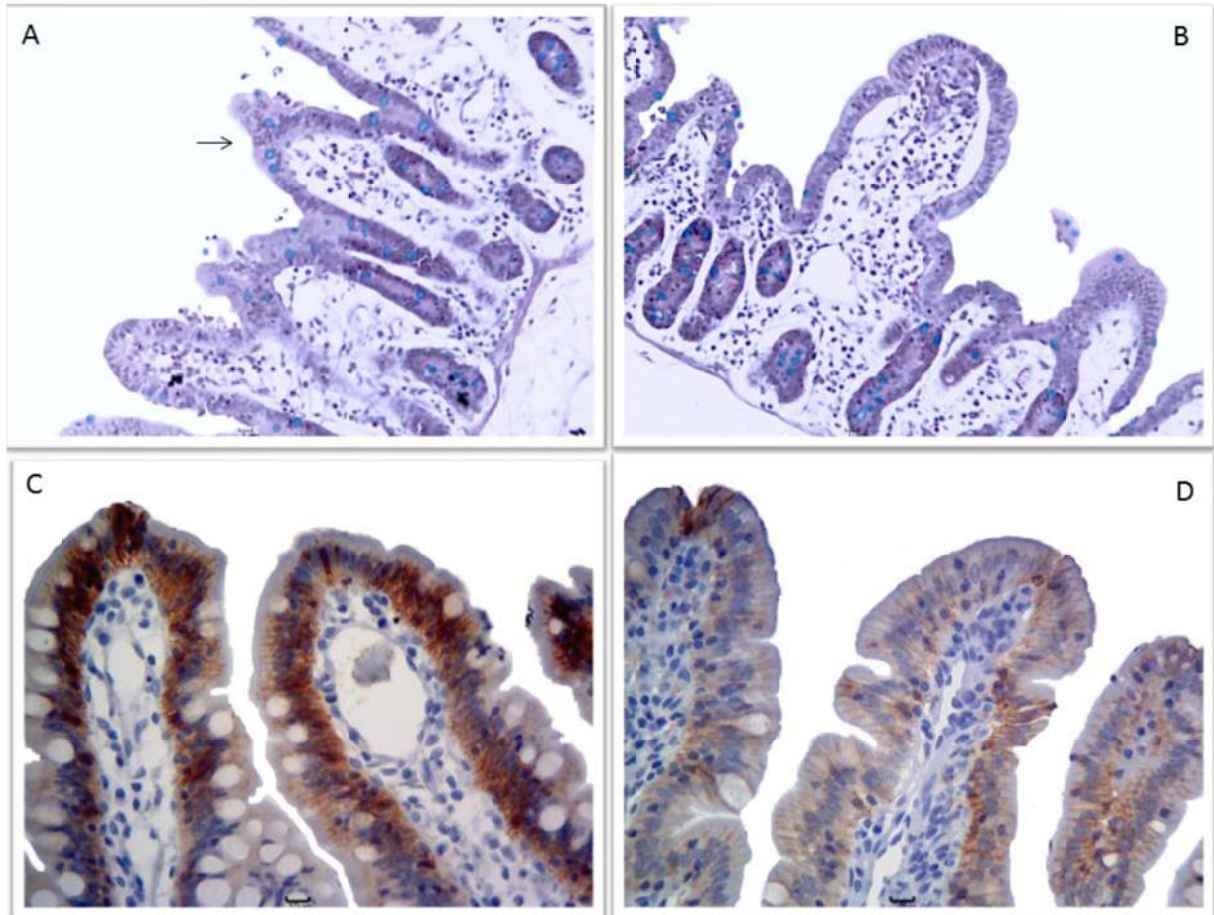


### 5.3.2 – Expressão de E-caderina

A análise imuno-histoquímica foi realizada apenas nos explantes expostos as micotoxinas isoladamente. O grupo tratado com ambas as micotoxinas apresentou alterações histológicas severas como desnudamento de vilosidades, impedindo a avaliação da expressão de proteínas de junção celular.

Foi observada diminuição significativa na expressão da proteína E-caderina no grupo tratado com FB1 (40%) e DON (93%) em relação ao controle (Figura 5.3.5).

**Figura 5.3.5** – Explantes de jejuno de leões tratados com micotoxinas. A. Controle. Células caliciformes (seta) (Alcian-blue. Barra 100  $\mu\text{m}$ ). B. DON. Redução no número de células caliciformes (Alcian-blue. Barra 100  $\mu\text{m}$ ). C. Controle. Expressão forte e homogênea para E-caderina (IHQ Barra 100  $\mu\text{m}$ ). D. FB1. Redução na expressão de E-caderina (IHQ Barra 100  $\mu\text{m}$ ).



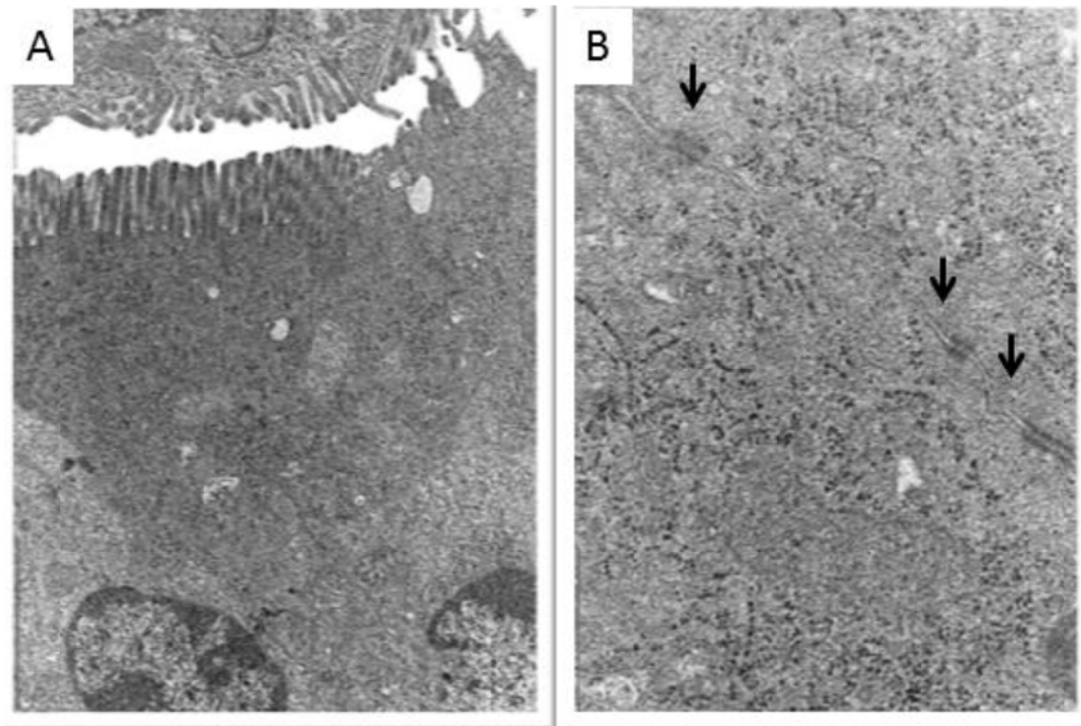
### 5.3.3 – Análise ultraestrutural

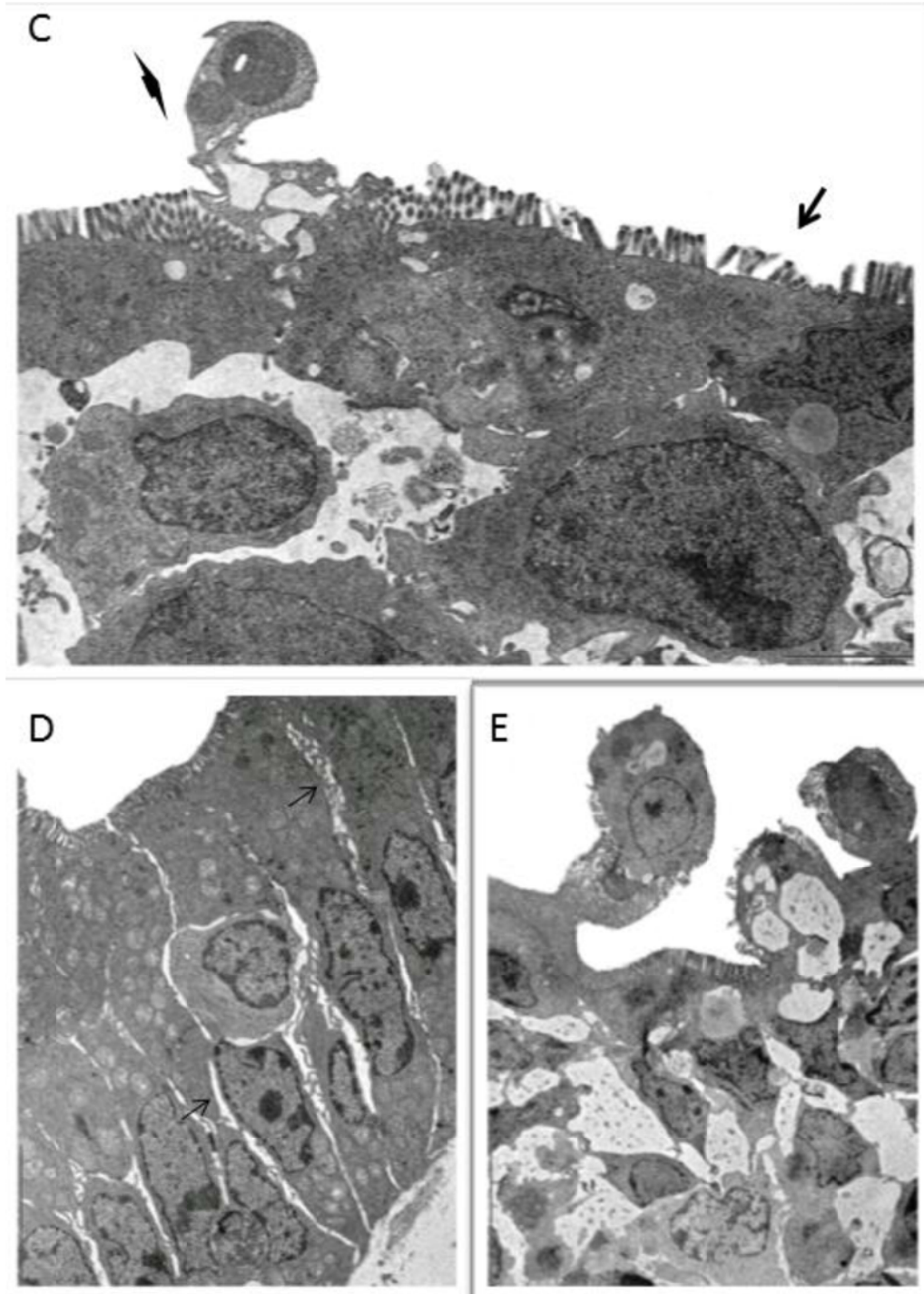
Os explantes controles e expostos à FB1 e ao DON foram submetidos à análise ultraestrutural. O grupo tratado com ambas as micotoxinas não foi avaliado em decorrência da intensidade das alterações histológicas observadas.

A análise ultraestrutural demonstrou nos explantes controles, integridade da membrana plasmática caracterizada por microvilosidades preservadas e complexos juncionais evidentes na região apical das vilosidades. O citoplasma, núcleo e organelas dos enterócitos encontravam-se íntegros e homogêneos (Figura 5.3.6 A,B). Células caliciformes com grânulos de secreção foram observadas entre os enterócitos dispostas em toda a extensão das vilosidades.

Os principais achados observados nos explantes incubados com FB1 e DON foram aumento do espaço intercelular, diminuição do tamanho e número de microvilosidades, vacuolização citoplasmática, núcleos com dobras e reentrâncias da carioteca e corpúsculos apoptóticos. Complexos juncionais não foram visualizados nos enterócitos. A presença de projeções citoplasmáticas, debris celulares e células descamadas no lúmen foram observadas principalmente nos explantes tratados com DON (Figura 5.3.6 D,E).

**Figura 5.3.6** –Análise ultraestrutural de explantes de jejuno de suínos tratados com FB1e DON. A. Controle: Integridade de microvilosidades e do citoplasma dos enterócitos (Bar 500 nm) B. Controle. Estruturas juncionais (seta) preservadas e grânulos de glicogênio dispersos no citoplasma (Bar 2  $\mu$ m). C. FB1. Descamação celular (cabeça seta) e perda de microvilosidades (seta) (Bar 2  $\mu$ m). D. Aumento do espaço intercelular e projeções citoplásmicas (seta) (Bar 5  $\mu$ m). E. DON. Descamação dos enterócitos e debris celulares (Bar 10  $\mu$ m).





#### 5.4 – Discussão

A integridade do intestino é dependente da preservação de vários fatores, como integridade da camada de muco, preservação de junções oclusivas e funcionalidade das células epiteliais (RANDALL et al., 2011). Fusariotoxinas ingeridas de modo crônico induzem alterações na morfologia intestinal e na imunidade local (BRACARENSE et al., 2012; GRENIER et al., 2011), afetando a função de barreira que o intestino desempenha.

Diminuição na expressão de proteínas de junção celular e indução de apoptose são alguns dos fatores associados aos efeitos deletérios de micotoxinas no intestino.

Para investigar os efeitos de fusariotoxinas isoladamente e em associação sobre o trato intestinal, utilizou-se o modelo *ex vivo*. Neste estudo demonstrou-se que a exposição durante quatro horas de explantes intestinais a fusariotoxinas induz alterações na altura de vilosidades, na densidade de células caliciformes e na morfologia dos enterócitos. As alterações ocorreram em todos os tratamentos, mas foram mais severas nos grupos que receberam DON isoladamente ou em associação.

O intestino é considerado um órgão alvo para ação de fumonisinas (BOUHET; OSWALD, 2007). As principais alterações histológicas observadas no grupo exposto às micotoxinas foram atrofia e fusão de vilosidades, sendo mais severas no grupo exposto ao DON e a multi-contaminação. Os achados histológicos são semelhantes aos descritos em intoxicações crônicas *in vivo* em suínos com FB1 e DON (LESSARD et al., 2009; ZIELONKA et al., 2009; BRACARENSE et al., 2012; PINTON et al., 2012), demonstrando que o modelo *ex vivo* é adequado para avaliar os efeitos de substâncias tóxicas sobre o intestino.

É interessante observar que mesmo com um período curto de incubação com as micotoxinas ambas as toxinas foram capazes de provocar lesões significativas. O desoxinivalenol induz a um estresse ribotóxico, comprometendo a síntese de proteínas e desencadeando apoptose (BAE; PETSKA, 2008), o que pode explicar as alterações microscópicas observadas no presente estudo. A fumonisina leva ao acúmulo de esfingalina e esfingosina que são produtos citotóxicos, pró-apoptóticos e inibidores de crescimento celular (VOSS et al., 2007).

A densidade de células caliciformes reflete a produção de muco, importante fator protetor da barreira intestinal que impede a adesão de patógenos aos enterócitos (MCGUCKIN et al., 2011). Nos explantes tratados com FB1 ocorreu redução significativa no número de células caliciformes, contrastando com o aumento descrito em intoxicações *in vivo* em aves (BROWN et al., 1992). Já em suínos, a ingestão crônica de FB1 não afetou o número dessas células (BRACARENSE et al., 2012). É provável que essa diferença esteja relacionada às doses utilizadas. Nesse estudo *in vivo* os animais ingeriram 6 mg/Kg de fumonisinas, sendo que os explantes foram expostos a 100  $\mu$ M, o que equivale a uma dose de 144 mg de FB1.

Redução significativa no número de células caliciformes também ocorreu nos explantes expostos ao DON e FB1+DON. Achados similares foram relatados em intoxicações crônicas *in vivo* (BRACARENSE et al., 2012). É provável que este efeito esteja

relacionado ao mecanismo de ação do DON que induz um estresse ribotóxico (BAE; PETSKA, 2008) e resulta na diminuição da síntese de proteínas como a mucina.

Alterações na altura das vilosidades implicam na redução da absorção de nutrientes (GARTNER; HIATT, 2007). Estudos prévios demonstram que a ingestão de ração contaminada com DON leva a diminuição na altura das vilosidades (BRACARENSE et al., 2012). Em relação à ingestão de FB1 os resultados são conflitantes. Doses de 30 mg/Kg e 2,8 $\mu$ Mol/Kg/PV, provocaram atrofia e fusão de vilosidades (DILKIN et al., 2004), no entanto a ingestão de uma única dose de 83 mg/Kg de FB1 (DILKIN et al., 2010) ou de 6mg/kg cronicamente (BRACARENSE et al., 2012) não induziram alterações morfológicas. A redução na altura de vilosidades induzida pelo DON é provavelmente consequência de uma diminuição da proliferação de enterócitos. Explantes expostos ao DON (10 $\mu$ M) apresentaram aumento significativo no número de células em apoptose (dados não apresentados). O DON é comprovadamente capaz de reduzir a proliferação celular *in vitro* em até 60%, redução comprovada também *in vivo* (PINTON et al., 2012). A diminuição que ocorreu no grupo exposto as duas micotoxinas também resulta da ação do DON, visto que a exposição a FB1 não alterou a altura das vilosidades.

A associação entre micotoxinas pode levar a efeitos aditivos, antagonísticos ou sinérgicos. Neste estudo, as alterações histológicas mais severas ocorreram no grupo tratado com DON, sendo que o grupo tratado com FB1 apresentou alterações mais leves. Ao analisarmos os explantes expostos a ambas as toxinas, constatou-se que ocorreu um efeito aditivo sobre a densidade de células caliciformes.

A função de barreira física do epitélio intestinal é resultado da integridade dos diferentes tipos de junção celular (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1982). A mensuração da resistência elétrica trans-epitelial (TEER) permite avaliar a função de barreira. A exposição a FB1 leva a diminuição da TEER em células intestinais cultivadas *in vitro* (BOUHET et al., 2004), enquanto o DON perturba as funções de membrana (OSWALD; TARANU, 2008). Neste estudo pode-se avaliar os grupos tratados com FB1 e DON isoladamente, pois o desnudamento apical severo observado no grupo tratado com FB1+DON não permitiu a análise da expressão de E-caderina. Em explantes, não existem relatos sobre a expressão de proteínas de junção celular. Assim como na intoxicação *in vivo* (BRACARENSE et al., 2012), também no modelo *ex vivo* houve diminuição da expressão de E-caderina, contribuindo para o aumento da permeabilidade paracelular e facilitando a invasão de patógenos.

A caracterização das alterações ultra-estruturais ocasionadas pela FB1 já foram caracterizadas em suínos em fígado e pâncreas (HASCHEK et al., 1992), no entanto até

o momento não há relatos sobre os efeitos dessa micotoxina na ultra-estrutura intestinal. As principais alterações ultraestruturais no grupo tratado com FB1 foram o aumento do espaço intercelular e desaparecimento de estruturas juncionais. Está bem estabelecido que as fumonisinas alteram o metabolismo de glicosfingolípídeos (YOO et al., 1992) e que moléculas lipídicas podem atuar em vias de sinalização de apoptose (EWUOLA; EGBUNIKE, 2010). Deste modo, pode-se supor que o acúmulo de bases esfingóides afeta a composição da bicamada de fosfolípídios da membrana e conseqüentemente as proteínas que compõem as estruturas juncionais.

A diminuição na expressão de E-caderina ocasionado na presença do DON pode ser explicada pelo mecanismo de atuação dessa micotoxina, uma vez que ocasiona a ativação das vias de sinalização das *mitogen activated protein kinases* (MAPKs), que modulam tanto a apoptose como a expressão de proteínas juncionais (LUCIOLI et al., 2013; PINTON et al., 2012). Os mecanismos de ativação das MAPKs estão relacionados a ativação da ERK1/2, sendo que esta ativação inibe a expressão de claudina-4 e conseqüentemente altera a permeabilidade paracelular. Este mecanismo de ação já foi comprovado por meio da inibição da ativação das vias de sinalização das MAPKs, sendo que esta via uma vez inibida impede o aumento da permeabilidade paracelular ocasionada pelo DON (PINTON et al., 2010).

Os achados ultraestruturais dos explantes tratados com as micotoxinas isoladamente reforçam os observados nas análises histológica e imuno-histoquímica em que as estruturas juncionais são severamente afetadas pela exposição às micotoxinas.

A perda de adesividade entre as células foi caracterizada pela ausência de estruturas juncionais, observadas nos explantes tratados com DON e FB1. No entanto, no grupo exposto ao DON as alterações foram mais intensas, levando a descamação de células para o lúmen. A presença de vacúolos intracitoplasmáticos reforça a ocorrência de alterações na permeabilidade celular, provavelmente por aumento no influxo de sódio e água. Em estudos prévios *in vivo* e *in vitro* verificou-se que os enterócitos expostos ao DON apresentavam redução na expressão de proteínas de junção oclusiva (claudina, ocludina) e de adesão (E-caderina) (PINTON et al., 2009; BRACARENSE et al., 2012).

Em conclusão, os explantes de jejuno demonstraram ser um modelo eficaz na avaliação da toxicidade intestinal. A exposição dos explantes às micotoxinas isoladamente induziu a lesões histológicas significativas. As análises imuno-histoquímicas e ultra-estruturais demonstraram o efeito das micotoxinas sobre as estruturas juncionais de enterócitos que modulam a função de barreira intestinal.

## Referências

BAE, H. K.; PESTKA, J. J. Deoxynivalenol induces p38 interaction with the ribosome in monocytes and macrophages. **Toxicological Sciences**. v. 105, p. 59–66, 2008.

BOUHET, S.; HOURCADE, E.; LOISEAU, N.; FIKRY, A.; MARTINEZ, S.; ROSELLI, M.; GALTIER, P.; MENGHERI, E.; OSWALD, I. P. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier. Function of porcine intestinal epithelial cells. **Toxicological Sciences**. v. 77, p. 165–171, 2004.

BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The intestine as a possible target for fumonisin toxicity. **Molecular Nutrition and Food Research**. v. 51, p. 925-931, 2007.

BRACARENSE, A. P.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B.; PACHECO, G. D.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**. p. 1776-1786, 2012.

BROWN, T.; ROTTINGHAUS, G.; WILLIAMS, M. Fumonisin mycotoxicosis in broilers: performances and pathology. **Avian Diseases**. v. 36, p. 450–454. 1992.

BUNNER, D. L.; MORRIS, E. R. Alteration of multiple cell membrane functions in L-6 myoblasts by T-2 toxin: an important mechanism of action. **Toxicology Applied Pharmacology**. v. 92, p. 113-121, 1988.

CAST, I. Mycotoxins - Risks in plant, animal and human systems. **Task Force Report**, n. 139. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, Iowa, p. 1-191, 2003.

DILKIN, P.; DIREITO, G.; SIMAS, M. M. S.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B. Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisin B1 containing *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. **Chemico-Biological Interactions**. v. 185 p. 157–16, 2010.

DILKIN, P.; HASSEGAWA, R.; REIS, T. A.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**. v. 34, n. 1, p. 175-191, 2004.

EWUOLA, E. O.; EGBUNIKE, G. N. Effects of dietary fumonisin B1 on the onset of puberty, semen quality, fertility rates and testicular morphology in male rabbits. **Reproduction**. v. 2, n. 139, p. 439-45, 2010.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Sistema Digestivo: Tubo Digestivo. In: \_\_\_\_\_. **Tratado de histologia em cores**. Tradução de Debora Milagres Pereira. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 387-416.

GRENIER, B.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G. D.; COSSALTER, A. M.; MOLL, W. D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I. P. Individual and combined effects of subclinical doses of deoxynivalenol and fumonisin in piglets. **Molecular Nutrition and Food Research**. n. 55, p. 761-771, 2011.

HASCHEK, W. M.; MOTELIN, G.; NESS, D. K.; HARLIN, K. S.; HALL, W. F.; VESONDER, R. F.; PETERSON, R. E.; BEASLEY, V. R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. **Mycopathologia**. v. 117, p. 83-96, 1992.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. S. **Ultraestrutura da célula animal**. Faculdade de medicina e Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo. Editora: Santos, v. 1. 1982.

KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. 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.

LESSARD, M.; BOUDRY, G.; SÈVE, B.; OSWALD, I. P.; LALLÈS, J. P. Intestinal physiology and peptidase activity in male pigs are modulated by consumption of corn culture extracts containing fumonisins. **Journal of Nutrition**. v.139, n. 7, p. 1303-1307, 2009.

LUCIOLI, J.; PINTON, P.; CALLU, P.; LAFFITTE, J.; GROSJEAN, F.; KOLF-CLAUW, M.; OSWALD, I. P.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: interest of *ex vivo* models as an alternative to *in vivo* experiments. **Toxicon**. *In Press*. 2013.

MCGUCKIN, M. A.; LINDÉN, S. K.; SUTTON, P.; FLORIN, T. H. Mucin dynamics and enteric pathogens. **Nature Reviews Microbiology**. v. 9, p. 265-278, 2011.

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

OBREMSKI, K.; GAJECKA, M.; ZIELONKA, L.; JAKIMIUK, E.; GAJECKI, M. Morphology and ultrastructure of small intestine mucosa in gilts with zearalenone mycotoxicosis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 8, n. 4, p. 301-307, 2005.

OSWALD, I. P.; DESAUTELS, C.; LAFFITTE, J.; FOURNOUT, S.; PERESS, Y.; ODIN, M.; LE BARSP, L. E.; BARS, J.; FAIRBROTHER, J. M. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 10, p. 5870–5874, 2003.

OSWALD, I.; TARANU, I. **Mycotoxins in farm animals**, India. Transworld Research Network, p. 131-154, 2008.

PESTKA, J. J.; ZHOU, H. R.; MOON, Y.; CHUNG, Y. J. 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.; NOUGAYRÈDE, J. P.; DEL RIO, J. C. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 237, p. 41-48, 2009.

PINTON, P.; BRAICU, C.; NOUGAYREDE, J.; LAFITTE, J.; TARANU, I.; OSWALD, I. P. Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. **Journal of Nutrition**. v. 140, p. 1956-1962, 2010.

PINTON, P.; TSYBULSKYY, D.; LUCIOLI, J.; LAFFITTE, J.; CALLU, P.; LYAZHRI, F.; GROSJEAN, F.; BRACARENSE, A.P.; KOLF-CLAUW, M.; OSWALD, I.P. Toxicity of deoxynivalenol and its acetylated derivatives on the intestine: differential effects on morphology, barrier function, tight junctions proteins and MAPKinases. **Toxicological Sciences**. v. 130, p. 180-90, 2012.

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.

VOSS, K. A.; SMITH, G. M.; HASCHECK, W. M. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. **Animal Feed Science and Technology**, v. 137, p. 299-325, 2007.

WITLOC, D. R.; WAYTT, R. D.; RUFF, M. D. Morphological changes in the avian intestine induced by citrinin and lack of effect of aflatoxin and T-2 toxin as seen with scanning electron microscopy. **Toxicon**. v. 15, p. 41-44, 1977.

YOO, W. S.; NORRED, W. P.; WANG, E.; MERRILL JR, A. H.; RILEY, R. T. Fumonisin inhibition of *de Novo* sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 114, p. 9-15, 1992.

ZIELONKA, L.; WIŚNIEWSKA, M.; GAJĘCKAM; OBREMSKI, K., GAJĘCKI, M. Influence of low doses of deoxynivalenol on histopathology of selected organs of pigs. **Polish Journal of Veterinary Sciences**. v. 12, p. 89-95, 2009.

## 6 CONCLUSÕES

- Os explantes de jejuno provenientes de suínos de 24 dias incubados por 4 horas demonstraram ser um modelo eficaz na avaliação da toxicidade intestinal. O modelo permite procedimentos experimentais mais controlados associados à redução no número de animais em experimentos laboratoriais.
- A exposição dos explantes às micotoxinas induziu alterações morfológicas significativas às funções de barreira física e absorptiva do intestino. Alterações como achatamento do epitélio intestinal, atrofia e fusão das vilosidades foram mais severas quando o intestino foi exposto ao desoxinivalenol. A presença das micotoxinas ocasionou ainda redução na expressão de E-caderina.
- Explantes expostos as micotoxinas apresentaram alterações ultra-estruturais que confirmaram os achados morfológicos e imunohistoquímicos, demonstrando o aumento da permeabilidade intercelular, diminuição do tamanho e número das microvilosidades, assim como a degeneração celular.

**APÊNDICE**

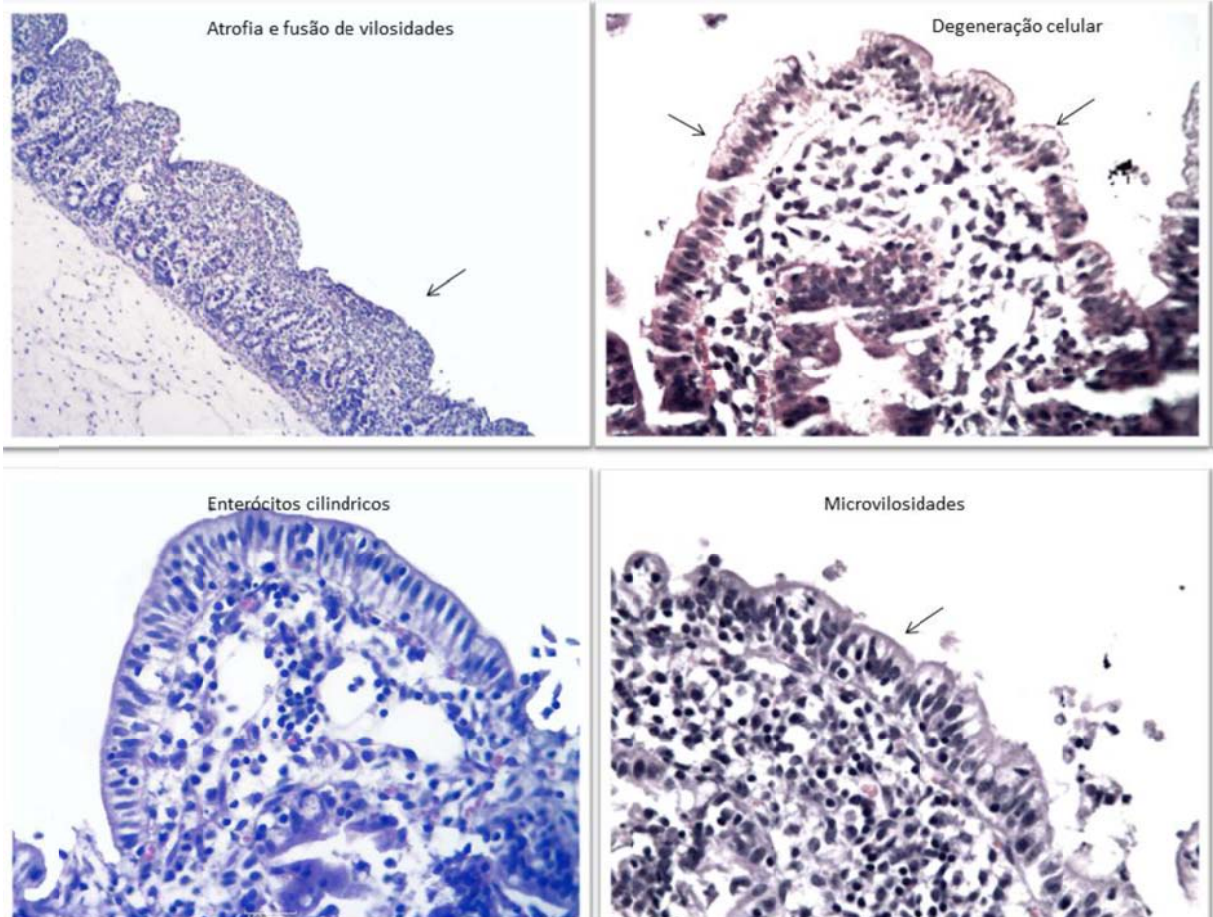
## APÊNDICE A

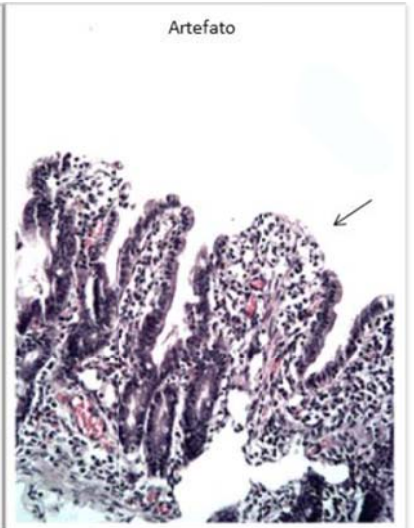
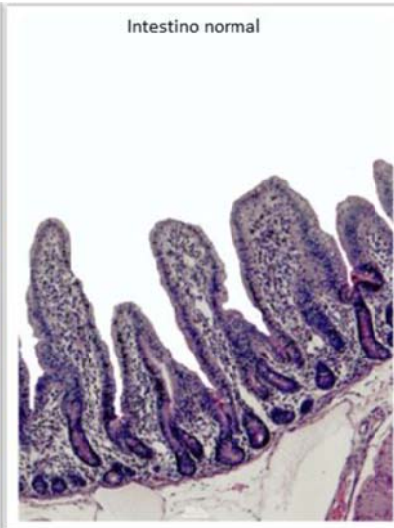
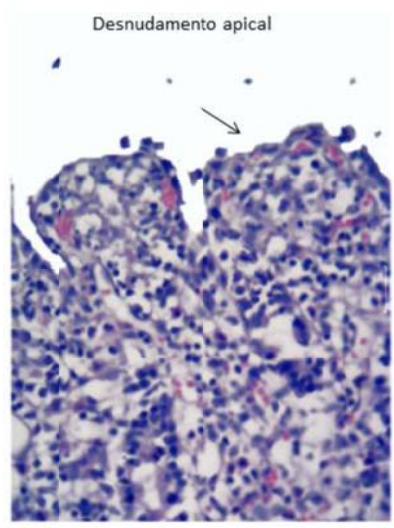
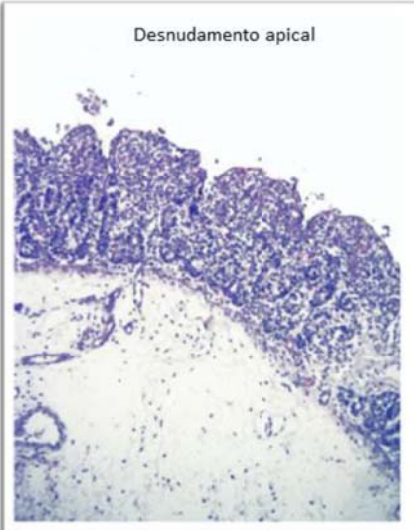
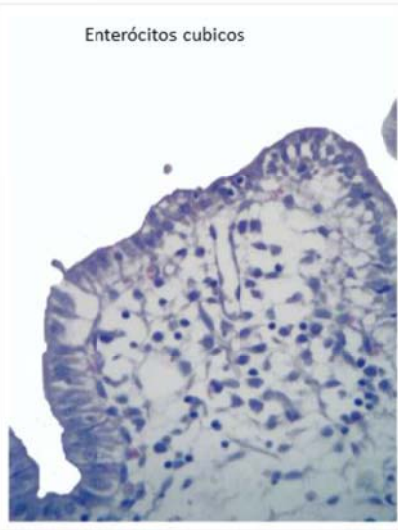
### Critérios para determinação do escore histológico intestinal

Alteração	Grau da alteração	Escore
Desnudamento apical	Ausência	2
	Presença localizada	1
	Presença difusa	0
Dilatação linfática	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Debris celulares	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Degeneração	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Atrofia vilosidades	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Fusão vilosidades	Ausência	2
	Presença localizada (>3)	1
	Presença difusa (>15)	0
Edema	Ausência	2
	Presença localizada (5-6)	1
	Presença difusa (>15)	0
Microvilosidades	Presença difusa	2
	Presença localizada	1
	Ausente	0
Células epiteliais	Cilíndricas	3
	Cúbicas	2
	Achatadas	1
	Ausente	0
Número de Vilosidades	>25	3
	15-25	2
	<15	1
	Ausente	0
Total máximo do escore		22

## APÊNDICE B

**Fotos ilustrativas das alterações histológicas observadas para graduação do escore tecidual**





## **ANEXO**

## ANEXO A

Resolução RDCN 7 de 18 de fevereiro de 2011-ANVISA

Limites máximos tolerados (LMT) em alimentos prontos e matérias primas estabelecidos pela ANVISA, por meio da resolução RDCN 7 de 18 de fevereiro de 2011,-com aplicação imediata.

Micotoxina	Alimento	LMT (?g/kg)
<b>Aflatoxina M1</b>		
	Leite fluido	0,5
	Leite em pó	5
	Queijos	2,5
<b>Aflatoxinas B1, B2, G1, G2</b>		
	Cereais e produtos de cereais, exceto milho e derivados, incluindo cevada malteada	5
	Feijão	5
	Castanhas exceto Castanha-do-Brasil, incluindo nozes, pistachios, avelãs e amêndoas	10
	Frutas desidratadas e secas	10
	Castanha-do-Brasil com casca para consumo direto	20
	Castanha-do-Brasil sem casca para consumo direto	10
	Castanha-do-Brasil sem casca para processamento posterior	15
	Alimentos à base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	1
	Fórmulas infantis para lactentes e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância	1
	Amêndoas de cacau	10
	Produtos de cacau e chocolate	5
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena 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	20

---

	Amendoim (com casca), (descascado, cru ou tostado), pasta de amendoim ou manteiga de amendoim	20
	Milho, milho em grão (inteiro, partido, amassado, moído), farinhas ou sêmolas de milho	20
<b>Ocratoxina A</b>		
	Cereais e produtos de cereais, incluindo cevada malteada	10
	Feijão	10
	Café torrado (moído ou em grão) e café solúvel	10
	Vinho e seus derivados	2
	Suco de uva e polpa de uva	2
	Especiarias: Capsicum spp. (o fruto seco, inteiro ou triturado, incluindo pimentas, pimenta em pó, pimenta decaiena e pimentão-doce) Piper spp. (o fruto, incluindo a menta 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	30
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	
	Produtos de cacau e chocolate	5,0
	Amêndoa de cacau	10
	Frutas secas e desidratadas	10
<b>Desoxinivalenol (DON)</b>		
	Arroz beneficiado e derivados	750
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
<b>Fumonisin (B1 + B2)</b>		
	Milho de pipoca	2000
	Alimentos a base de milho para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	200
<b>Zearalenona</b>		
	Alimentos a base de cereais para alimentação infantil (lactentes e crianças de primeira infância)	20

---

## ANEXO B

### Normas para Publicação 1 Manuscrito

#### TOXICOLOGY IN VITRO

##### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Each author's academic or professional qualifications should also be listed. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

##### Abstract

Abstract: A self-contained summary of the objectives, results and significance of the study, not exceeding 200 words. Uninformative sentences such as "the significance of the results is discussed" are not acceptable.

##### Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

**Highlights**

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, or, maximum 20 words per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

**Keywords**

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

**Abbreviations**

Abbreviations should be used sparingly. Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

**Acknowledgements**

Acknowledgements: Providing recognition of sources of funding and donations of materials, and including any thanks the authors may wish to accord for advisory, technical or other assistance, since authorship should be limited to those who have made a major contribution to the study and to the preparation of the paper. Authors are advised to obtain approval for the wording of any acknowledgement from those whose help is noted.

**Nomenclature**

The metric system is the standard for all measurements. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, wherever possible, with the aid of CAS Registry and EC numbers.

**Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

**Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

*Table footnotes*

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

**Artwork***Electric artwork**General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:  
<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

#### **Please do not:**

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

No information that can be included in the legend should appear on the figure; the following standard symbols are preferred for line drawings: (closed triangle), (open triangle), (closed square), (open square), (closed circle), (open circle), (open circle with a dot in the middle), +, (open diamond). The legends for photomicrographs must state the staining method and magnification. Authors should bear in mind that the figures they submit may be subjected to photographic reduction. If figures that have already been published under copyright are to be reproduced in the Journal (e.g. in reviews), copies of letters from the first publisher and the original author giving permission for such reproduction must always accompany the submitted manuscript.

#### **Reference management software**

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

## ANEXO C

## Comissão de Ética no uso de animais



Universidade  
Estadual de

---

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

OP. ETIC. CEUA Nº 03/12

Londrina, 09 de janeiro de 2012

Prezado Pesquisador

O CEUAUEL, nascido em 16 de dezembro de 2011, avalia o projeto de pesquisa intitulado "Avaliação histológica e ultra-estrutural de explantes intestinais de suínos expostos à fumonísina B1", registrado na CEUA sob o processo nº 25/11, desenvolvido sob sua responsabilidade, julgando-o aprovado para execução por entender que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 9 suínos com 6 semanas de idade. Serão utilizados 3 animais com 3 repetições. O efeito da fumonísina B1 será avaliado em explantes de jejuno proximal de suínos in vitro seguido de análise histológica. Os experimentos estão previstos para serem desenvolvidos em 24 meses após sua aprovação no CEUAUEL.

Cumpra-se que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação do CEUAUEL anteriormente à execução das modificações.

Seu e-mail para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

*Waldemar Ap. Velloso Junior*  
 Prof. Dr. Waldemar Aparecido Velloso Junior  
 Coordenador do CEUAUEL

Ilms. Srs.  
**Profa. Dra. Ana Paula F. R. L. Bracarense**  
 Coordenadora do Projeto  
 Laboratório de Anatomia Patológica  
 Programa de Pós-graduação em Ciência Animal  
 Centro de Ciências Agrárias

Contribuição para o Projeto de Pesquisa do Curso de Pós-graduação em Ciências Agrárias