



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NÁDIA CRISTINE WEINERT

**MODELO HEPÁTICO EX VIVO EM SUÍNOS:
EFEITO DO ACETAMINOFENO, DA FUMONISINA E DO
ÁCIDO FÍTICO**

NÁDIA CRISTINE WEINERT

**MODELO HEPÁTICO EX VIVO EM SUÍNOS:
EFEITO DO ACETAMINOFENO, DA FUMONISINA E DO
ÁCIDO FÍTICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Frederico R. L. Bracarense.

Londrina
2020

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

- 423 Weinert, Nádia Cristine.
Modelo hepático ex vivo em suínos: efeito do acetaminofeno, da fumonisina e do ácido fítico / Nádia Cristine Weinert. - Londrina, 2020.
90 f. : il.
- Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.
Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2020.
Inclui bibliografia.
1. Biomarcadores hepáticos - Tese. 2. Estresse Oxidativo - Tese. 3. Morfologia - Tese. 4. Suínos - Tese. I. Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, Ana Paula. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

NÁDIA CRISTINE WEINERT

**MODELO HEPÁTICO EX VIVO EM SUÍNOS:
EFEITO DO ACETAMINOFENO, DA FUMONISINA E DO ÁCIDO
FÍTICO**

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Frederico
R. L. Bracarense
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Profa. Dra. Heloisa Godoi Bertagnon
Universidade do Centro-Oeste – UNICENTRO

Profa. Dra. Juliana Rubira Gerez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

rofa. Dra. Meire Christina Seki
Universidade do Centro-Oeste – UNICENTRO

Londrina, 20 de março 2020.

A Deus.

Ao meu esposo e familiares.

AGRADECIMENTOS

1
2
3 Em primeiro lugar agradeço a Deus, fonte imensurável de amor e por sempre
4 me mostrar que para Ele nada é impossível. Agradeço pela minha vida, pela minha
5 família, pelo amparo nos momentos difíceis e por ter me conduzido sempre pelo
6 melhor caminho.

7 Agradeço especialmente a minha orientadora, Profa. Dra. Ana Paula Frederico
8 Rodrigues Loureiro Bracarense, por ter concedido esta oportunidade. Agradeço
9 infinitamente a confiança, pois sem me conhecer, abriu as portas do Laboratório de
10 Patologia e da sua casa, compartilhando seus conhecimentos comigo. Sempre foi
11 gentil, mesmo sabendo das minhas atividades além de Londrina. Gratidão por todo o
12 conhecimento, apoio, compreensão e amizade que sempre demonstrou ter nas mais
13 diversas situações, do início ao término desta tese. Espero de coração, que possamos
14 continuar as parcerias na área da pesquisa.

15 Agradeço a banca de defesa de tese composta pela Profa. Dra. Juliana Rubira
16 Gerez, Profa. Dra. Karina Keller Marques da Costa Flaiban, Profa. Dra. Heloisa Godoi
17 Bertagnon e Profa. Dra. Meire Christina Seki por aceitarem o convite e contribuírem
18 com seu conhecimento para a melhoria deste trabalho.

19 Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Patologia Animal da
20 Universidade Estadual de Londrina, principalmente as meninas do meu coração: Juh,
21 Leilitcha, Dani, Thalita e Isa, pela boa disposição, bons momentos de descontração
22 no espetinho, no restaurante universitário, toda força transmitida, as boas risadas,
23 conversas e a nossa amizade que ficou. Agradeço a gentileza, carinho e auxílio na
24 execução deste projeto das ICs Thaynara e Ana Laura. Agradeço ao convívio e
25 carinho do pessoal do laboratório: Andressa, Ricardo, Marielen, Milton, Weslem, Elis,
26 Ana, Bárbara, Victor, Vivian, Gabi, Mari e Claudia. Principalmente aqueles que
27 ajudaram de forma integral durante a execução dos experimentos, sem a ajuda de
28 vocês nada disso seria possível.

29 As amigas que o “doutorado” me apresentou: Paula Fernanda Massini e Keli
30 Libardi Ramella, por toda força, apoio e conselhos. Vocês compartilharam comigo
31 momentos decisivos para que estivéssemos juntas neste período. Fomos as últimas
32 a participar da entrevista para o ingresso e aquele momento de ansiedade nos uniu e

1 assim pudemos traçar metas e objetivos durante estes quatro anos. Obrigada por
2 terem tornado a tarefa mais fácil e por todos os bons momentos de descontração!

3 Um agradecimento especial a minha amiga Suelen Suphoronski, que me
4 acolheu em sua casa durante todo o período do doutorado. Seu apoio e companhia
5 foram fundamentais para que conseguisse finalizar esta etapa. Obrigada!

6 Agradeço também ao Departamento de Medicina Veterinária da Unicentro
7 (DEVET) por ter possibilitado que eu pudesse me afastar e me deslocar até Londrina
8 para a realização das disciplinas e do projeto.

9 Gratidão a todos os alunos da Unicentro, que prontamente aceitavam participar
10 das incansáveis reposições em horários alternativos, o que contribuiu para a
11 finalização das disciplinas e tarefas em Londrina.

12 A professora Sônia Maria Kurchaidt do Departamento de Matemática da
13 Unicentro e amiga Juliana Rubira, pelo apoio nas análises estatísticas.

14 As minhas amigas com tudo o que o significado da palavra amizade implica!
15 Ana Elisa Machado, Kate Buzi e Laís Werner, por todos os conselhos, risadas e apoio
16 incondicional. Amo vocês!

17 À minha família, em especial a minha mãe, Juscélia Vieira Weinert (*in*
18 *memorian*) que semeou e cultivou em mim este amor por estudar e buscar
19 conhecimento. Gratidão minha mãe! Hoje sigo seus passos, aprendendo
20 constantemente e ensinando meus alunos. Desejo ter sempre a sua determinação e
21 alegria. Agradeço pela sua breve passagem em minha vida, porém fica o desejo do
22 nosso reencontro.

23 A minha vó Izilanda, exemplo de força e coragem, pelas energias sempre
24 positivas e pelos milhares de beijos e abraços virtuais que trocamos nestes quatro
25 anos. Ao meu pai, irmãos Aline e Luiz Guilherme e sobrinha Ágata Luiza, meus
26 grandes amores. Sem dúvida, as minhas conquistas são para vocês. Agradeço por
27 entenderem e apoiarem as minhas escolhas (mesmo achando que era loucura) e
28 compreenderem que muitas vezes a privação do nosso convívio, foi necessária para
29 minha formação e crescimento.

30 E em especial, ao meu marido/companheiro Mirodion Santos Oliveira, que
31 caminhou comigo lado a lado durante este período. Compreendeu minha ausência em
32 muitos momentos que poderiam ser compartilhados, renunciando da minha atenção,

1 carinho e disponibilidade, mas sempre entendendo todas as minhas necessidades.
2 Obrigada meu amor, por toda força, carinho e pelas comidas maravilhosas que eu
3 encontrava a cada retorno para casa. Perdoe-me pelas ausências. Obrigada por me
4 valorizar e por SEMPRE acreditar que eu era/sou capaz! Obrigada por fazer parte da
5 minha vida e por me fazer feliz.

6 Gratidão as nossas filhas (Lara, Margot, Mongris, Bazuca, Mitcha, Emy e Apis)
7 por deixarem a vida corrida do dia a dia mais serena e renovarem diariamente as
8 nossas energias com muito carinho e amor.

9 “Gratidão às forças superiores que sempre estão bem próximas” (Iria Graciete
10 Weinert Chaves).

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45

*“Desistir...eu já pensei seriamente nisso,
mas nunca me levei realmente a sério. É
que tem mais chão nos meus olhos do que
o cansaço nas minhas pernas, mais
esperança nos meus passos do que
tristeza nos meus ombros, mais estrada no
meu coração do que medo na minha
cabeça”*

Cora Carolina

1 WEINERT, Nádia Cristine. **Modelo hepático ex vivo em suínos: efeito do**
2 **acetaminofeno, da fumonisina e do ácido fítico.** 2020. 90f. Tese (Doutorado em
3 Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

4 5 **RESUMO**

6
7 Devido à similaridade orgânica ao homem, suínos são utilizados como modelos
8 experimentais. Os explantes *ex vivo* são promissores na avaliação de xenobióticos no
9 organismo. Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da fumonisina (FB₁), acetaminofeno
10 e do ácido fítico (IP6) utilizando-se o modelo de explante hepático de suínos. Foram
11 realizados dois experimentos, nos quais foram analisados: resposta ao estresse
12 oxidativo, morfologia e biomarcadores hepáticos. O experimento (E1) avaliou o efeito
13 de IP6 (5mM) nos explantes expostos ao acetaminofeno (20mM). Utilizou-se nove
14 suínos de terminação provenientes de frigoríficos (grupo experimental 1 - GE1) e seis
15 suínos com 40 dias (grupo experimental 2 - GE2), estes eutanasiados. Os explantes
16 (8 mm) passaram pelos seguintes tratamentos durante quatro horas: controle 4h
17 (somente meio); IP6 (5mM); acetaminofeno (20mM) e IP6 + acetaminofeno. Explantes
18 não incubados (Ctrl 0h) foram colhidos para comparação com incubados (Ctrl 4h). Os
19 sobrenadantes foram colhidos após 1/2h, 2h e 4h de incubação para análise de
20 biomarcadores (ALT, AST, FA, GGT, proteína e colesterol). Após 4h, (3/tratamento)
21 foram fixados, processados para análise histológica ou congelados (2/tratamento) a -
22 80°C, para avaliação do estresse oxidativo: substâncias reativas ao ácido
23 tiobarbitúrico (TBARS), tetrazólio de nitroazul (NBT), capacidade antioxidante por
24 meio da glutathiona reduzida (GSH), potencial de redução do ferro (FRAP) e
25 capacidade de eliminação de radicais livres (ABTS). Para GE1 e GE2, na presença
26 de IP6, observou-se atividade enzimática menor de GGT e FA em relação ao controle.
27 Com acetaminofeno, a atividade enzimática (FA, AST, ALT), PT e colesterol reduziram
28 comparado ao controle. Para o GE2, notou-se queda de FA e ALT para acetaminofeno
29 mais IP6 em relação ao controle. Os explantes incubados apenas com meio de cultura
30 (Ctrl 4h) apresentaram aspectos histológicos similares aos não incubados (Ctrl 0h).
31 Assim, a incubação não interferiu na integridade do tecido. Para o ensaio TBARS
32 (GE1), ocorreu diferença entre controle 4h e acetaminofeno, menor para este último.
33 Estes achados indicam que provavelmente não houve peroxidação lipídica nos
34 explantes expostos ao acetaminofeno. Houve redução da GSH no grupo exposto ao
35 IP6. Para o GE2, houve aumento da capacidade antioxidante (GSH, FRAP e ABTS)
36 do grupo acetaminofeno comparado com controle 4h, IP6 e acetaminofeno acrescido
37 de IP6 e para o NBT diferença entre controle 4h e acetaminofeno, maior para este
38 último, indicando possível lesão oxidativa. No segundo experimento (E2), a
39 metodologia foi similar ao primeiro, sendo os explantes submetidos aos tratamentos:
40 controle 0h; controle 4h; IP6 (5mM); FB₁ (100 µM); FB₁ + IP6. Não houve diferença no
41 escore da lesão entre GE1 e GE2. Para o GE1 e GE2, os tratamentos IP6 e FB₁ + IP6
42 diminuíram a atividade de FA em relação ao controle e FB₁. Quando o IP6 foi
43 adicionado ao FB₁, reduziu a atividade de ALT e PT comparado ao FB₁ e ao controle.
44 Para o GE1 e GE2, a FB₁ induziu ao aumento de GSH comparado ao IP6 e controle,
45 respectivamente, enquanto a incubação com FB₁ + IP6 diminuiu GSH em
46 comparação ao FB₁. Os resultados obtidos evidenciaram uma ação protetora do IP6.

47
48 **Palavras-chave:** Biomarcadores. Estresse Oxidativo. IP6. Morfologia. Suínos.

1 WEINERT, Nádia Cristine. **Ex vivo liver model in swine: effect of acetaminophen,**
2 **fumonisin and phytic acid.** 2020. 90p. Thesis (Doctorate degree in Animal Science)
3 – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

4 **ABSTRACT**

5 Due to the organic similarity to man, pigs are used as experimental models. *Ex*
6 *vivo* explants are promising in the evaluation of xenobiotics in the body. Thus, the
7 objective was to evaluate the effects of fumonisin (FB1), acetaminophen and phytic
8 acid (IP6) using the swine liver explant model. Two experiments were carried out, in
9 which it where analyzed: response to oxidative stress, liver morphology and
10 biomarkers. The experiment (E1) evaluated the effect of IP6 (5mM) on explants
11 exposed to acetaminophen (20mM). Nine finishing pigs were used from
12 slaughterhouses (experimental group 1 - GE1) and six 40-day-old pigs (experimental
13 group 2 - GE2) were used, euthanized. The explants (8 mm) underwent the following
14 treatments for four hours: control 4h (media only); IP6 (5mM); acetaminophen (20mM)
15 and IP6 + acetaminophen. Un incubated explants (Ctrl 0h) were collected for
16 comparison with incubated. Supernatants were collected after 1 / 2h, 2h and 4h of
17 incubation for analysis of biomarkers (ALT, AST, FA, GGT, protein and cholesterol).
18 After 4h, (3 / treatment) were fixed, processed for histological analysis or frozen (2 /
19 treatment) at -80°C, to assess oxidative stress: substances reactive to thiobarbituric
20 acid (TBARS), nitro-blue tetrazolium (NBT) and capacity antioxidant by means of
21 reduced glutathione (GSH), iron reduction potential (FRAP) and ability to eliminate free
22 radicals (ABTS). For GE1 and GE2, in the presence of IP6, less GGT and FA enzyme
23 activity was observed compared to the control. With acetaminophen, the enzymatic
24 activity (FA, AST, ALT), PT ando cholesterol decreased compared to the control. For
25 GE2, there was a decrease in FA and ALT for acetaminophen plus IP6 compared to
26 control. The explants incubated only with culture media (Ctrl 4h) presented similar
27 histological aspects to those not incubated (Ctrl 0h). Thus, incubation did not interfere
28 with tissue integrity. For the TBARS trial (GE1), there was a difference between the 4h
29 control and acetaminophen, which was smaller for the latter. These findings indicate
30 that there was probably no lipid peroxidation in the explants exposed to
31 acetaminophen. There was a reduction in GSH in the group exposed to IP6. For GE2,
32 there was an increase in the antioxidant capacity (GSH, FRAP and ABTS) of the
33 acetaminophen group compared to the 4h control, IP6 and acetaminophen plus IP6
34 and for the NBT, the difference between the 4h control and acetaminophen, greater for
35 the latter, indicating possible oxidative damage. In the second experiment (E2), the
36 methodology was similar to the first, with the explants subjected to treatments: control
37 0h; control 4h; IP6 (5mM); FB1 (100 µM); FB1 + IP6. There was no difference in the
38 injury score between GE1 and GE2. For GE1 and GE2, treatments IP6 and FB1 + IP6
39 decreased the activity of AF in relation to control and FB1. When IP6 was added to
40 FB1, it reduced the activity of ALT and PT compared to FB1 and the control. For GE1
41 and GE2, FB1 induced an increase in GSH compared to IP6 and control, respectively,
42 while incubation with FB1 + IP6 decreased GSH compared to FB1. The results
43 obtained showed a protective action of IP6.

44 **Keywords:** Biomarkers. IP6. Morphology. Oxidative stress. Pigs.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO I

Figura 1 – Efeitos do acetaminofeno e ácido fítico (IP6) em explantes hepáticos de suínos. A. Controle 4 horas. Morfologia hepática normal. HE. Barra 20 µm. B. Grupo IP6. Observa-se discreta vacuolização citoplasmática. HE. Barra 20 µm. C. Grupo acetaminofeno. Observa-se moderado infiltrado linfocitário periportal. HE. Barra 100 µm. D. Grupo IP6+acetaminofeno (GE1). Observa-se discreta desorganização trabecular. HE. Barra 100 µm. E. Escore médio de lesão em explantes hepáticos de suínos de terminação (GE1). F. Escore médio de lesão em explantes hepáticos de leitões (GE2).....49

Figura 2 - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa hepática (GE1). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Peroxidação lipídica e produção de ânion superóxido. A. Substâncias reativas ao ácido tiobárbiturico (TBARS). B. Tetrazólio de nitroazul (NBT).....50

Figura 3 - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa hepática (GE1). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Defesa hepática antioxidante. A. Capacidade de eliminação de radicais livres (ABTS). B. Glutathiona reduzida (GSH). C. Potencial de redução do ferro (FRAP).....51

Figura 4 - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa hepática (GE2). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Peroxidação lipídica e produção de ânion superóxido. A. Substâncias reativas ao ácido tiobárbiturico (TBARS). B. Tetrazólio de nitroazul (NBT).....52

Figura 5 - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa hepática (GE2). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Defesa hepática antioxidante. A. Capacidade de eliminação de radicais livres (ABTS). B. Glutathiona reduzida (GSH). C. Potencial de redução do ferro (FRAP).....53

ARTIGO II

Figure 1 - Histological aspects of pigs' liver explants. A. Control group. Normal aspect of liver. HE. Bar 100 µm. B. Phytic acid (IP6) group. Normal aspect of liver. C and D. Fumonisin B₁ group. Nuclear vacuolization of hepatocytes (thin arrow) (C) and hepatocyte megalocytosis (dotted arrow) (D). HE. Bar 100 µm. E. FB₁ + IP6. Normal aspect of liver. HE. Bar 100 µm. F. Liver lesion score in finishing pigs (EG1). Morphological score (AU—Arbitrary Units). G. Liver lesion score in piglets (EG2) Morphological score (AU—Arbitrary Units).....65

Figure 2 - Effects of fumonisin (FB₁) and phytic acid (IP6) on liver oxidative stress in EG1. Explants exposed to control treatment (□); IP6 (5mM) (▤); FB₁ (100µM) (■) and FB₁ (100 µM) plus IP6 (5 mM) (▨). Lipid peroxidation and superoxide anion production. A. Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). B. Nitroblue tetrazolium (NBT). Liver

1 antioxidant defense. C. Free-radical scavenging ability (ABTS). D. Ferric reducing ability
2 potential (FRAP). E. Reduced glutathione (GSH).....66

3
4 **Figure 3** - Effects of fumonisin FB₁ (FB₁) and phytic acid (IP6) on liver oxidative stress in the
5 EG2. Explants exposed to control treatment (□); IP6 (5mM) (▨); FB1 (100μM) (■) and
6 FB₁ (100 μM) + IP6 (5 mM) (▩). Lipid peroxidation and superoxide anion production. A.
7 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). B. Nitroblue tetrazolium (NBT). Liver
8 antioxidant defense. C. Free-radical scavenging ability (ABTS). D. Ferric reducing ability
9 potential (FRAP). E. Reduced glutathione (GSH).....67

10
11 **Figure 4** - A. Supernatant harvest for biochemical measurements. B. Collection of liver
12 explants after 4-hours for histopathological processing, in order to verify the different injury
13 scores.....72

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1 – Efeito do tratamento independentemente do tempo nos parâmetros bioquímicos do sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de suínos de terminação (GE1) expostos ao meio de cultura (Controle); ácido fítico (IP6) e 20 mM de acetaminofeno (Acet).....44

Tabela 2 - Efeito do tratamento independentemente do tempo nos parâmetros bioquímicos do sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de leitões (GE2) expostos ao meio de cultura (Controle); ácido fítico (IP6); 20 mM de acetaminofeno (Acet) e Acet (20mM) mais IP6 (5mM).....45

Tabela 3 - Efeito do tratamento dependente do tempo nos parâmetros bioquímicos no sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de suínos de terminação (GE1) expostos ao meio de cultura (Controle); ácido fítico (IP6), 20 mM de acetaminofeno (Acet) e Acet (20mM) mais IP6 (5mM).....47

Tabela 4 - Efeito do tratamento independentemente do tempo nos parâmetros bioquímicos do sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de leitões (GE2) expostos ao meio de cultura (Controle); ácido fítico (IP6); 20 mM de acetaminofeno (Acet) e Acet (20mM) mais IP6 (5mM).....47

ARTIGO II

Table 1 - Effect of treatment independently of the time on the biochemical parameters in the culture supernatant of hepatic explants of finishing pigs (EG1) exposed to the culture medium (Control - CTRL); 5 mM of phytic acid (IP6); 100 μ M of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100 μ M) μ M plus IP6 (5mM).....61

Table 2 - Effect of treatment independently of the time on the biochemical parameters in the culture supernatant of hepatic explants of piglets (EG2) exposed to the culture medium (Control - CTRL); 5 mM of phytic acid (IP6); 100 μ M of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100 μ M) μ M plus IP6 (5mM).....62

Table 3 - Effect of treatment dependently of the time on the biochemical parameters in the culture supernatant of hepatic explants of finishing pigs (EG1) exposed to the culture medium (Control - CTRL); 5mM of phytic acid (IP6); 100 μ M of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100 μ M) plus IP6 (5mM).....63

Table 4 - Effect of treatment dependently of the time on the biochemical parameters in the culture supernatant of hepatic explants of piglets (EG2) exposed to the culture medium (Control - CTRL); 5 mM of phytic acid (IP6); 100 μ M of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100 μ M) μ M plus IP6 (5mM).....63

1
2
3

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2, 2- azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
Ctrl	Controle
DMEN	Dulbecco Modified Eagle Medium
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fosfatase alcalina
FB ₁	Fumonisina
FRAP	Poder de redução do ferro
GGT	Gama glutamiltransferase
GSH	Glutationa reduzida
HE	Hematoxilina eosina
IP6	Ácido fítico
NBT	Nitroazul de tetrazólio
SFB	Soro fetal bovino
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UI/L	Unidade Internacional/Litro
μM	Micromolar
mM	Milimolar

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15

SUMÁRIO

1		
2		
3	1 INTRODUÇÃO.....	10
4	2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
5	2.1 EXPLANTES TECIDUAIS UTILIZADOS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	12
6	2.2 MICOTOXINA: Fumonisina B ₁ (FB ₁).....	13
7	2.3 ACETAMINOFENO.....	17
8	2.3.1 N-acetil-p-benzoquinonaimina: o metabólito hepatotóxico.....	17
9	2.3.2 Hepatotoxicidade.....	18
10	2.4 ENZIMAS DE EXTRAVAZAMENTO.....	19
11	2.4.1 ALT/ TGP (alanina aminotransferase/ transaminase glutâmico pirúvica)	19
12	2.4.2 AST/ TGO (aspartato aminotransferase/ transaminase glutâmico oxalacética).20	
13	2.5 ENZIMAS DE INDUÇÃO.....	20
14	2.5.1 GGT (γ -glutamilttransferase).....	20
15	2.5.2 FA (fosfatase alcalina).....	21
16	2.6 ÁCIDO FÍTICO.....	21
17	2.7 ESTRESSE OXIDATIVO.....	23
18	3 REFERÊNCIAS.....	26
19	4 HIPÓTESES.....	36
20	5 OBJETIVOS.....	37
21	5.1 OBJETIVO GERAL.....	37
22	5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
23	6 ARTIGO I - Hepatotoxicidade do acetaminofeno em explantes hepáticos de suínos:	
24	avaliação dos biomarcadores de integridade celular, sistema biliar, síntese, escore	
25	histopatológico e capacidade antioxidante	38
26	7 ARTIGO II - Effects of the Phytic Acid and Injury Induced by Fumonisin (FB₁) in Liver	
27	Explants of Piglets and Finishing Pigs: Oxidative Stress, Histological Lesions and	
28	Biomarkers.....	58
29	8 CONCLUSÕES	81
30	ANEXOS.....	83

31

32

33

1 1 INTRODUÇÃO

2
3 Os modelos *ex vivo*, caracterizam-se pelo cultivo de fragmentos de órgãos que
4 são colhidos e posteriormente incubados em placas com meio de cultura em
5 temperatura semelhante à corpórea, simulando as condições de um organismo vivo.
6 A metodologia dos explantes também proporciona a possibilidade de colher várias
7 amostras de um único doador, aumentando assim a confiabilidade estatística da
8 investigação e reduzindo o número de animais a serem utilizados, concordando com
9 o princípio dos 3 R's da experimentação animal (*Replacement, Reduction e*
10 *Refinement*) proposto por Russell e Burch em 1959. No entanto, uma das maiores
11 limitações da técnica é o tempo de viabilidade celular devido à hipóxia a qual o tecido
12 é submetido durante o tempo de cultivo (RANDALL *et al.*, 2011).

13 Neste sentido, os suínos são muito utilizados em pesquisas por apresentarem
14 grandes similaridades anatômicas e fisiológicas com o ser humano. O fígado é um
15 órgão que também compartilha dessa similaridade e cada vez mais esta espécie vem
16 sendo utilizada para experimentos laboratoriais e procedimentos com xenobióticos
17 (SIMÕES, 2004; GUILLOTEAU *et al.*, 2010).

18 O fígado é de vital importância para o bom funcionamento do organismo. Este
19 órgão atua no armazenamento e degradação de substâncias, hormônios e participa
20 da síntese e secreção de sais biliares, além de promover a regulação dos
21 carboidratos, proteínas e lipídios. Devido às inúmeras e relevantes funções que
22 desempenha no organismo, foram desenvolvidas várias técnicas para avaliar seu
23 funcionamento, bem como para apontar possíveis lesões neste órgão (GUYTON,
24 1997).

25 Existem fármacos que causam hepatotoxicidade, como o acetaminofeno que é
26 classificado como um anti-inflamatório não esteroidal. Quando este princípio ativo se
27 encontra em concentrações elevadas, ocorre o processo de oxidação no fígado pelo
28 citocromo P450 e com essa metabolização forma-se o N-acetil-p-benzoquinona-imina
29 (NAPQI), que é um metabólito tóxico para o organismo (ANDERSSON, 1990).

30 Além deste fármaco, alimentos estão sujeitos à contaminação por substâncias
31 também hepatotóxicas, cuja ingestão é capaz de causar sérios transtornos ao
32 organismo do homem e dos animais (DILKIN *et al.*, 2010). As micotoxinas são
33 metabólitos secundários produzidos por certos fungos. Os fungos podem crescer em
34 uma variedade de grãos e alimentos, incluindo cereais, frutas secas, maçãs e

1 especiarias, geralmente sob condições quentes e úmidas. Assim, quando alimentos
2 contaminados são ingeridos pelo homem e animais, podem provocar uma doença
3 denominada de micotoxicose, devido a exposição crônica com baixas doses (MOSS,
4 1991).

5 Dentre as micotoxinas, as fumonisinas são moléculas estruturalmente
6 relacionadas, sendo que algumas já foram isoladas e caracterizadas. As fumonisinas
7 B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂) foram isoladas de uma amostra de *Fusarium verticillioides*, porém
8 outras espécies do gênero *Fusarium* também são produtoras dessas micotoxinas. A
9 toxicidade de FB₁ foi comprovada em algumas espécies animais, ocasionando edema
10 pulmonar em suínos e leucoencefalomalácia em equinos, além de câncer esofágico e
11 hepático em seres humanos (DILKIN *et al.*, 2010).

12 Desta forma, substâncias antioxidantes vem sendo estudadas, como o ácido
13 fítico (IP6) que inibe a formação de radicais livres e é encontrado na maioria dos grãos,
14 sementes e feijões (GHIRETTI, 1997). Além disso, o ácido fítico pode diminuir a
15 incidência de câncer e proteger contra algumas doenças inflamatórias (GRAF, 1990),
16 sendo que esses efeitos protetores foram associados à redução da formação de
17 substâncias derivadas da peroxidação lipídica (DA SILVA, 2014).

18 Portanto, a utilização de um modelo *ex vivo* hepático suíno busca elucidar a
19 acessibilidade e reprodutibilidade das alterações celulares diante da exposição ao
20 acetaminofeno e FB₁, bem como quais são os mecanismos celulares de proteção
21 hepática que surgem a partir da utilização do ácido fítico, minimizando perdas
22 econômicas e riscos à saúde única.

23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O fígado é um órgão localizado na parte mais cranial do abdômen, tem um tamanho médio variável de 1 a 1,5% do peso corpóreo em herbívoros, até 3 a 5% em carnívoros. A sua unidade básica é denominada lóbulo hepático, que é uma estrutura cilíndrica, com comprimento e diâmetro variável em milímetros. Os lóbulos hepáticos estão constituídos por hepatócitos, arteríolas, vênulas e pequenos canalículos biliares, que formam o arcabouço estrutural do fígado (DROUGAS *et al.*, 1996).

Embora apresente pequenas diferenças morfológicas, o fígado dos suínos tem um metabolismo semelhante ao dos humanos (SWINDLE; SMITH, 1998). Trabalhos relacionados à hemodinâmica hepática, metabolismo da glicose, lactato e glicérol foram desenvolvidos e validados em suínos (DROUGAS *et al.*, 1996). Estas similaridades entre as espécies são observadas em diversos sistemas orgânicos, como o sistema gastrointestinal (GUILLOTEAU *et al.*, 2010), cardiovascular e pulmonar. O tamanho e a morfologia são próximos ao do ser humano, além da semelhança fisiológica nas áreas de fluxo sanguíneo coronário, crescimento do aparelho cardiovascular, pulmonar e desenvolvimento neonatal. Outros órgãos como a pele e a vesícula biliar dos suínos também são utilizados em modelos experimentais para seres humanos (SWINDLE; SMITH, 1998). Por isto, cada vez mais os suínos têm sido empregados como modelos animais em estudos laboratoriais.

2.1 EXPLANTES TECIDUAIS NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

A reavaliação da utilização de animais nos experimentos é tendência mundial e teve início a partir do surgimento de um programa internacionalmente reconhecido denominado de 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*), que objetiva, além de diminuir o número de animais utilizados na pesquisa, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes *in vivo* (RUSSEL; BURCH, 1959; BALLS, 1994; FLECKNELL, 1994; SCHECHTMAN, 2002). Deste modo, em busca de alternativa à experimentação *in vivo*, desde a década de 30, estudos buscam desenvolver técnicas substitutivas, entre estas pode-se destacar o cultivo de explantes modelo *ex vivo*. Neste modelo experimental, fragmentos de órgãos colhidos por biópsia são incubados em situações que mimetizam as condições do organismo vivo (FELL; ROBISON, 1930; BANSAL *et al.*, 2009; RANDALL; TURTON; FOSTER,

1 2011). Ximénez *et al.* (2017) empregaram um modelo hepático *ex vivo* humano para
2 avaliar a expressão diferencial de genes patogênicos de *Entamoeba histolytica* x *E.*
3 *dispar* e a interação hospedeiro-parasita (incluindo a resposta imune humana).

4 O emprego da técnica *ex vivo* mostra um grande potencial no estudo de
5 micotoxinas ou demais agentes tóxicos ao organismo humano e animal (BANSAL *et*
6 *al.*, 2009; KOLF-CLAUW *et al.*, 2009; RANDALL *et al.*, 2011). O desenvolvimento do
7 modelo busca também atender aos requisitos éticos e legais presentes na
8 normatização (decreto 93.933 aprovado em 1987) do Conselho Nacional de Saúde
9 que determina que todo estudo deve ser planejado de maneira a obter o máximo de
10 informações utilizando-se o menor número de animais (BASSO e BRACARENSE,
11 2013).

12 Os dados da literatura demonstram que o suíno é um modelo animal eficaz em
13 pesquisas, podendo ser amplamente utilizado na busca do conhecimento das
14 afecções que afetam o homem. Esta técnica promissora é adequada para estudos
15 toxicológicos, nutricionais e patológicos, para ambas as espécies (RANDALL *et al.*,
16 2011), porém apresenta algumas limitações como o tempo de incubação do tecido,
17 viabilidade celular e manutenção das condições existentes *in vivo*, portanto boa parte
18 dos estudos com o modelo de explante busca aprimorar as técnicas de forma a
19 superar as limitações contribuindo em diversos ramos da ciência, com utilização de
20 diferentes tecidos (BASSO; BRACARENSE, 2013).

21 Sendo assim, o propósito do presente trabalho foi realizar abordagem sobre o
22 princípio dos 3Rs, considerando a implantação e validação de métodos alternativos
23 como a utilização de explantes hepáticos, caracterizando lesões e distúrbios
24 funcionais, principalmente aplicados no contexto da toxicidade, avaliando o uso de
25 biomarcadores hepáticos, estresse oxidativo e caracterização histológica.

27 2.2 MICOTOXINAS: Fumonisina B₁ (FB₁)

28
29

30 Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular, produzidas
31 por fungos em situações de estresse (CAST, 2003). A contaminação de cereais, grãos
32 e alimentos por fungos, é favorecida pelas condições ambientais, sendo que as
33 micotoxinas fumonisina B₁ (FB₁) e o desoxinivalenol (DON) são as principais
34 encontradas, tanto nas fontes de alimentação humana quanto animal (TARANU *et al.*,
35 2008). Elas também podem ser transportadas em produtos de origem animal, como

1 carne, ovos e leite, comprometendo assim a segurança dos consumidores humanos
2 e as concentrações nos alimentos para animais devem ser monitoradas
3 continuamente para apoiar a avaliação de riscos (GRUBER *et al.*, 2019). As
4 micotoxinas não podem ser destruídas pelo processamento comum dos alimentos e
5 com isso a exposição de animais e humanos a estas toxinas é inevitável (MUNKVOLD;
6 DESJARDINS, 1997).

7 A ingestão de micotoxinas pode causar um quadro clínico chamado de
8 micotoxicose, na qual a gravidade vai depender da toxicidade da toxina ingerida como
9 também de outros fatores como: idade, escore físico do indivíduo e o tempo de
10 exposição à substância (BHATNAGAR *et al.*, 2002). O diagnóstico da doença é muito
11 difícil, pois os sinais clínicos nos indivíduos são variados e inespecíficos, como
12 diarreia, hemorragias, imunossupressão ou diminuição da produtividade (KANORA;
13 MAES, 2009).

14 Em animais e humanos, intoxicações podem ter um curso agudo ou crônico.
15 Quando agudo, o quadro está ligado à ingestão de altas doses de toxinas,
16 ocasionando o aparecimento de forma rápida dos sinais clínicos, podendo levar o
17 indivíduo à morte. Por sua vez, a intoxicação crônica, tem a característica de não
18 demonstrar sinais clínicos, no entanto pode trazer prejuízos em parâmetros
19 zootécnicos e causa perdas significativas na produção animal (SANTÚRIO *et al.*,
20 2000; SANTIN *et al.*, 2000).

21 Diferentes linhas de pesquisas descrevem os efeitos das micotoxinas, tanto em
22 humanos como animais (FREIRE *et al.*, 2007; VITORINO, 2011), na qual a espécie
23 suína é considerada uma das mais vulneráveis às intoxicações por fumonisina e
24 desoxinivalenol (MALLMANN; DILKIN, 2007; YAZAR; OMURTAG, 2008).

25 As fumonisinas são um grupo de micotoxinas produzidas de forma significativa
26 principalmente pelos fungos *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*
27 (CREPPY, 2002) que contaminam o milho e seus derivados pelo mundo todo
28 (TURNER; NIKIEMA; WILD, 1999).

29 A infestação de milho com *F. verticillioides* e a consequente contaminação por
30 fumonisina são facilitadas por altas temperaturas e baixa precipitação em torno da
31 silagem. A casuística de FB₁ em alimentos produzidos no Brasil tem alcançando
32 índices próximos a 90% nos mais variados alimentos. A FB₁ é a principal
33 representante desse grupo comprometendo sobretudo suínos e aves (RODRIGUEZ-

1 AMAYA; SABINO, 2002), por sua vez as fumonisinas B₂ e B₃ aparecem em menores
2 proporções (DILKIN; MALLMAM, 2011).

3 No Brasil, a percentagem de contaminação do milho por FB₁ varia dependendo
4 da região e condições climáticas, podendo chegar a 100% (CALDAS; SILVA, 2007).
5 Em humanos, o nível de ingestão tolerável de FB₁ é de 2µg/kg de peso/dia
6 (STOCMANN *et al.*, 2008). Não estão bem estabelecidos níveis máximos toleráveis
7 de FB₁ para os animais, mas o Comitê de Micotoxinas da Associação Americana de
8 Diagnóstico Laboratorial Veterinário tem recomendado níveis máximos de 5, 10, 50 e
9 50 µg/g de ração para equinos, suínos, bovinos e aves respectivamente (MUNKVOLD;
10 DESJARDINS, 1997). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)
11 determinou por meio da Resolução RDC n°59 (26 de dezembro de 2013) que a partir
12 de janeiro de 2016, prorrogado até 1º de janeiro de 2017, o limite máximo tolerável de
13 FB₁ em milho em grão e subprodutos é de 1000-1500 µg/Kg (ANVISA, 2011).

14 A fumonisina gera perdas econômicas na produção animal (DILKIN *et al.*,
15 2004). A intoxicação por FB₁ nos animais causa leucoencefalomalácia em equinos e
16 nefrotoxicidade em ovinos (MALLMANN *et al.*, 1999; VOSS *et al.*, 2001), deficiência
17 imunológica e lesões no fígado e nos rins em galinhas (BIANCHI *et al.*, 2005),
18 hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em bovinos (MATHUR *et al.*, 2001) e câncer
19 hepático e renal em roedores (SCOTT, 1993).

20 Suínos intoxicados com altas doses de FB₁ (acima de 100mg/kg/ração)
21 apresentam sinais clínicos de intoxicação aguda geralmente de três a cinco dias após
22 o início de ingestão da ração contaminada (HASCHECK *et al.*, 2001). O quadro clínico
23 caracteriza-se por edema pulmonar, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e lesões
24 pancreáticas (MALLMANN; DILKIN, 2007). Pequenas doses de micotoxinas levam ao
25 aparecimento de lesões hepáticas em leitões desmamados (CASTEEL *et al.*, 1993).
26 Estas alterações podem ser avaliadas por meio do aumento das atividades
27 enzimáticas séricas (CASTEEL *et al.*, 1994). A FB₁ é pouco absorvida no trato
28 gastrointestinal, sendo eliminada rapidamente com pouca acumulação no fígado e nos
29 rins (VOSS *et al.*, 2002), entretanto as maiores concentrações são vistas em tais
30 órgãos (PRELUSKY *et al.*, 1996). Esta toxina é resistente ao calor sendo apenas
31 degradada em processos nos quais a temperatura ultrapassa 150°C (KAWASHIMA;
32 SOARES, 2006).

33 Em seres humanos, a ingestão crônica de alimentos contaminados com FB₁ foi
34 associada a câncer esofágico (WESTHUIZEN *et al.*, 1999). Em suínos, a intoxicação

1 crônica por FB₁ ocorre pelo consumo de ração com baixas concentrações da toxina e
2 por um tempo prolongado. Suínos alimentados com ração contaminada na
3 concentração de 6 mg de fumonisina/kg durante cinco semanas apresentaram edema
4 pulmonar e lesões hepáticas como vacuolização e megalocitose (GRENIER *et al.*,
5 2011). Também já foi relatado, letargia, perda de apetite, taquicardia e taquipnéia,
6 após ingestão de alimentos contaminados por doses entre 1 a 20 mg/Kg de FB₁
7 (POZZI *et al.*, 2002; DILKIN; MALLMAM, 2011). Fêmeas gestantes podem apresentar
8 aborto e se este não ocorrer, os leitões podem apresentar sinais de edema pulmonar
9 (DILKIN; MALLMAM, 2011). Estes sinais variam conforme a concentração da
10 micotoxina ingerida, sexo, idade e tempo de consumo (HASCHEK *et al.*, 1992; POZZI
11 *et al.*, 2002).

12 A morte de suíno intoxicado ocorre normalmente poucas horas após o início da
13 apresentação destes sinais. Na necropsia, pode ser observado edema pulmonar,
14 hidrotórax, icterícia, fígado escurecido e firme. Doses baixas induzem degeneração
15 hepática progressiva, enquanto doses mais altas causam edema pulmonar
16 (OSWEILER *et al.*, 1992).

17 A intoxicação crônica com fumonisina em suínos está associada a elevação da
18 atividade de fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase e gamaglutamil
19 transferase (KANEKO, 1997). Observa-se também aumento dos níveis sanguíneos
20 de colesterol e de bilirrubina (OSWEILER *et al.*, 1992; MOTELIN *et al.*, 1994).

21 O mecanismo de ação das fumonisinas ainda não é perfeitamente conhecido,
22 todavia Wang *et al.* (1991) propuseram que a FB₁ poderia intervir na biossíntese de
23 esfingolipídios ou “*turnover*” de esfingosina, porque existe uma similaridade da
24 molécula de FB₁ com o complexo amino álcool esfingosina, que é um dos trinta ou
25 mais amino álcoois da cadeia longa encontrados nos esfingolipídios de várias
26 espécies. Os esfingolipídios mais abundantes dos tecidos animais são a esfingosina
27 e os glicoesfingolipídeos. A inibição de biossíntese dos esfingolipídios pode ter um
28 profundo efeito sobre a célula, uma vez que esses componentes têm papel importante
29 na estrutura da membrana, comunicação celular, interação intracelular e matriz
30 celular, regulação de fatores de crescimento, como mensageiro de vários fatores,
31 incluindo fator de necrose tumoral, interleucina 1 e fator de crescimento de nervos
32 (MERRILL *et al.*, 1993). FB₁ inibe a fagocitose e a biossíntese de esfingolipídeos nos
33 macrófagos pulmonares, induzindo um acúmulo de material membranoso nas células

1 endoteliais dos capilares pulmonares. Essa alteração parece ser específica a esse
2 tipo de célula e a espécie suína (HASCHEK *et al.*, 2001).

3 A inibição dessa via metabólica resulta na depleção do complexo esfingolipídio
4 e no aumento intracelular da concentração de esfinganina e esfingosina, as quais na
5 célula podem desencadear sinais pró-apoptóticos, citotóxicos e imunotóxicos. Além
6 disso, quando acumuladas no meio intracelular, esses compostos deixam a célula e
7 aparecem no sangue periférico (WANG *et al.*, 1992) e na urina (RILLEY *et al.*, 1994;
8 WANG *et al.*, 1999). Assim, a elevação das bases esfingoides em urina, soro e tecidos
9 pode ser usada como biomarcador na exposição às fumonisinas (RILLEY *et al.*, 1994).

10 O estresse oxidativo estimulado por FB₁ pode perturbar a capacidade
11 antioxidante celular e a transdução das vias de sinais para células alvo, por aumento
12 da produção de espécies de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica (STOCKMANN-
13 JUVALA, *et al.* 2004).

15 2.3 ACETAMINOFENO

16
17
18 O acetaminofeno conhecido também como paracetamol é um fármaco com
19 ação analgésica e antipirética. Metabolizado pelo fígado, mais especificamente no
20 retículo endoplasmático liso dos hepatócitos (DAHLIN, 1984). Sua ligação com
21 proteínas plasmáticas é de 10% a 30%, podendo chegar a 50% em casos de
22 sobredose. Apresenta capacidade de atravessar a barreira placentária e hemato-
23 encefálica (SEBBEN *et al.*, 2010) e sua eliminação é renal.

25 2.3.1 N-acetil-p-benzoquinonaimina: o metabólito hepatotóxico

26
27 A principal via de metabolização do paracetamol é a hepática, a qual ocorre por
28 meio de três mecanismos metabólicos: conjugação com ácido glicurônico
29 (glicuronidação), sulfatação e oxidação. A via oxidativa produz um metabólito
30 altamente tóxico, que em condições terapêuticas, se une a glutatona, formando
31 conjugados de cisteína e ácido mercaptúrico. Enquanto a glicuronidação e a
32 sulfatação produzem metabólitos atóxicos (SEBBEN *et al.*, 2010).

33 Em doses acima de 4 g/dia, após a saturação das vias metabólicas principais,
34 o paracetamol sofre oxidação, gerando o metabólito tóxico n-acetil-p-
35 benzoquinonaimina (NAPQI) (HE *et al.*, 2011).

2.3.2 Hepatotoxicidade

O acetaminofeno é considerado hepatotóxico em doses altas e pode promover lesão hepatocelular (JUNIOR, 2011). A alteração característica é o aumento da atividade das enzimas ALT e AST (transaminases hepáticas). O período de 72 horas a cinco dias é de máxima expressão da hepatotoxicidade, podendo evoluir para falência hepática aguda (SEBBEN *et al.*, 2010).

Quando se encontra em concentrações elevadas, o princípio ativo passa a sofrer o processo de oxidação mais importante do fígado pelo citocromo P450 e essa metabolização resulta na formação do N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI), que é um metabólito tóxico para o organismo (ANDERSSON, 1990). Entretanto, o organismo tenta compensar esse desbalanço e conjuga esse metabólito com a glutathione, porém um dos principais motivos da intoxicação é a diminuição significativa da glutathione, ocorrendo a saturação dessa via (MAZRAATI, 2018). Por consequência, o NAPQI pode reagir com as macromoléculas celulares do fígado causando lesões por meio do estresse oxidativo (CHAN *et al.*, 2018).

Para diagnosticar a intoxicação e/ou exposição por acetaminofeno, podem ser feitos diversos exames complementares, como a dosagem sérica deste princípio ativo, na qual a obtenção da amostra deve ser 4 horas após a administração; transaminases, nas quais a atividade sérica de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) se elevam após a administração de acetaminofeno. Pode-se ainda mensurar bilirrubina, albumina (que diminui e permanece baixa durante a falência hepática), glicemia, amilase e coagulograma (SEBBEN *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2011). A característica bioquímica mais relevante da toxicidade por acetaminofeno é a alta atividade das aminotransferases (MAZRAATI, 2018).

2.4 ENZIMAS DE EXTRAVAZAMENTO

Para Thrall *et al.* (2015), os exames laboratoriais hepáticos podem ser divididos em testes que mensuram lesão nos hepatócitos, que detectam colestase e por fim os que avaliam a função hepática. As lesões nos hepatócitos são detectadas por meio da mensuração de enzimas séricas liberadas após ruptura celular hepática, fornecendo informações da extensão, magnitude e curso (aguda ou crônica) da lesão.

1 A liberação destas enzimas pode ocorrer também por necrose e alteração na
2 permeabilidade (reações inflamatórias e degeneração celular).

3 Os testes convencionais para avaliação hepática fornecem informações sobre
4 a integridade do hepatócito (ALT, AST e SDH) e integridade do sistema biliar (FA e
5 GGT). A função hepática pode ser avaliada testando a capacidade excretora do fígado
6 (ácidos biliares e bilirrubina) e função de síntese (NH₃/ureia, albumina, fibrinogênio,
7 protrombina entre outros) (KANEKO, 1997).

9 2.4.1 ALT/ TGP (alanina aminotransferase/ transaminase glutâmico pirúvica)

11 ALT é uma enzima encontrada livre no citoplasma dos hepatócitos, então no
12 rompimento e alteração da permeabilidade celular ela é liberada na corrente
13 circulatória sanguínea (THRALL *et al.*, 2015). Esta enzima catalisa a reação de
14 transaminação reversível de alanina e α -cetogluturato em piruvato e glutamato, e
15 utiliza como cofator o piridoxal-fosfato. Os cães e gatos apresentam maiores
16 concentrações desta enzima que as demais espécies, mas não necessariamente ela
17 é uma enzima hepato-específica, pois também pode ser encontrada no músculo
18 estriado esquelético e cardíaco, rins e eritrócitos (GONZALEZ; SILVA, 2006).

19 A atividade da ALT é baixa no citoplasma dos hepatócitos de equinos, suínos
20 e ruminantes para ter valor diagnóstico, não sendo desta forma uma prova confiável
21 para estas espécies (KANEKO, 1997).

22 Várias condições como hipóxia, acúmulo de lipídios hepáticos, doenças
23 bacterianas e virais, inflamações, neoplasias hepáticas, endo e exotoxinas, bem como
24 medicamentos podem induzir a lesão hepatocelular e a consequente aumento da
25 atividade enzimática de ALT no sangue dos cães e gatos. ALT é uma enzima que tem
26 curso de elevação agudo, mas sua elevação pode ser relacionada à lesão encontrada,
27 tendo seu pico de liberação detectado de 3 a 4 dias após a lesão, mas com retorno
28 basal em até 14 dias (GONZALEZ; SILVA, 2006). Segundo Thrall *et al.* (2015), ALT
29 tem uma meia vida estimada de 17 a 60 horas em cães e de 3,5 horas em gatos. Em
30 animais com lesões crônicas pode haver um discreto aumento desta enzima, o que
31 pode ser quase imperceptível.

32

1 2.4.2 AST/ TGO (aspartato aminotransferase/ transaminase glutâmico oxalacética)

2
3 AST promove a catalisação de transaminação reversível de aspartato e α -
4 cetoglutarato em oxalacetato e glutamato e tem como cofator piridoxal-fosfato. É
5 encontrada predominantemente no citoplasma e nas mitocôndrias dos hepatócitos, e
6 nas células musculares esqueléticas e cardíacas de todas as espécies domésticas
7 (GONZALEZ; SILVA, 2006).

8 A atividade enzimática de AST podem ser induzidos por várias alterações,
9 semelhantes as citadas para elevação de ALT (hipóxia, infecções, inflamações,
10 neoplasias), sendo que pode ocorrer aumento em exercício intenso e em deficiência
11 de vitamina E e selênio (THRALL *et al.*, 2015).

12 13 2.5 ENZIMAS DE INDUÇÃO

14
15
16 Durante a colestase o fluxo biliar fica comprometido de forma parcial ou total,
17 no decorrer deste processo as células biliares liberam algumas enzimas que podem
18 ser detectadas na corrente circulatória.

19 20 2.5.1 GGT (γ -glutamyltransferase)

21
22 A GGT é uma enzima que tem papel de catalisar a transferência de grupos
23 gamacarboxila do glutamato a um peptídeo, sendo ele geralmente o dipeptídeo Gly-
24 Gly, podendo ser encontrada nas membranas e no citosol de células, especialmente
25 no epitélio dos ductos biliares e túbulos renais (GONZALEZ; SILVA, 2006). De acordo
26 com Thrall *et al.* (2015), GGT é uma enzima que pode estar elevada em lesão hepática
27 aguda, e pode ser encontrada na maioria dos tecidos corporais, dentre eles, no
28 pâncreas, células tubulares renais e glândula mamária de cadelas, ovelhas e vacas.
29 Porém, as enzimas que estão presentes no plasma sanguíneo, geralmente têm
30 origem hepática, devido a maior concentração nos ductos biliares.

31

2.5.2 FA (fosfatase alcalina)

De acordo com González e Silva (2006), a FA promove a catalisação da hidrólise de ésteres do ácido fosfórico sob condições alcalinas, tendo um pH de ótima atividade *in vitro* em torno de 10, existindo isoenzimas de FA na membrana celular de vários tecidos. Os órgãos como fígado, rins, intestinos, pâncreas, ossos e a placenta, tem maiores concentrações de FA nas membranas celulares; são duas formas de isoenzimas produzidas a partir de dois genes diferentes, uma intestinal e uma tecidual inespecífica, esta última pode sofrer alteração pós-translacional adicional nos diferentes tecidos, formando diferentes isoformas nos ossos, rins, placenta e fígado. Também de acordo com os mesmos autores, a maior parte de FA sérica é de origem hepática, devido à isoenzima estar presente nas células do epitélio biliar e nas membranas dos canalículos biliares.

2.6 ÁCIDO FÍTICO

O ácido fítico (IP6) é um antioxidante presente naturalmente em cereais, leguminosas, nozes, sementes oleaginosas e pólen, compondo cerca de 1-5 % de peso, sendo responsável por 60-90 % do fósforo total de sementes (LOLAS; PALAMIDIS; MARKAKIS, 1976; GRAF; EATON, 1990). É encontrado naturalmente na forma de sais, como fitato de Na^2Mg^5 , K^2Mg^5 e Ca^2Mg^5 (PLAAMI, 1997), é inerte e muito estável, podendo ser estocado em solução alcalina ou neutra a 5°C por vários meses (GRAF e EATON, 1990).

Sua estrutura química é composta por seis grupos de fosfato ligados a um anel de inositol e quando todos os seis carbonos estão aderidos aos grupos fosfatos, é conhecido como inositol hexafosfato (ácido fítico, IP6, InsP6, inositol hexafostato ou mio-inositol-1,2,3,4,5,6- hexafosfato). O agrupamento dos fosfatos nas posições 1, 2 e 3 (axial-equatorial-axial) é único no IP6, cuja estrutura é responsável pela interação específica com o ferro, inibindo sua habilidade em catalisar a formação de radicais hidroxila (reação de Fenton), tornando o IP6 um antioxidante fisiológico potente (VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2006).

A enzima fitase é indispensável para que ocorra a hidrólise e liberação do fósforo da molécula de fitato (VATS; BANERJEE, 2004). Estas enzimas são

1 largamente disseminadas na natureza e podem ser encontradas nas plantas, nos
2 animais e nos micro-organismos (PACHECO, 2010).

3 Existem três nomenclaturas que são utilizadas para denominar o substrato da
4 fitase, são eles: ácido fítico, fitato e fitin (SELLE; RAVINDRAN, 2007).

5 Quando formuladas, as rações de aves e suínos possuem o fornecimento
6 insuficiente de fósforo disponível pelas fontes de origem vegetal para suprir as
7 exigências nutricionais de maneira que o desempenho seja desejável, assim há a
8 necessidade de suplementação com fontes inorgânicas de fósforo (ROSTAGNO;
9 SILVA, 1998).

10 Fitases possuem não só o papel de poupar a retirada de fósforo no ambiente,
11 como de diminuir a capacidade poluente dos dejetos dos animais, tendo em
12 consideração que este mineral poderá ser absorvido a nível intestinal, evitando assim
13 a sua disseminação no solo e em fontes hídricas, fato que poderia acarretar em
14 impactos ambientais (FREITAS *et al.*, 2013).

15 Na maioria das vezes os fitatos são solúveis em meio ácido e quase
16 completamente insolúveis em meios alcalinos. A junção de fitatos à minerais leva à
17 formação de complexos que se precipitam no intestino (duodeno) (JONGBLOED *et*
18 *al.*, 1993). Na espécie suína, os complexos se desenvolvem no ambiente ácido do
19 estômago (KIES *et al.*, 2006).

20 Quando presente na dieta, o ácido fítico pode causar o desenvolvimento desses
21 complexos com diversos nutrientes, principalmente com o ferro, fazendo com que este
22 mineral fique menos disponível para a absorção (LINDER, 1991). Esta característica
23 do ácido fítico em formar um quelato com o ferro, deixando-o inativo, proporciona uma
24 função antioxidante, inibindo a oxidação com formação de radicais hidroxila (EMPSON
25 *et al.*, 1991).

26 Esta ação antioxidante do ácido fítico foi constatado por diversos
27 pesquisadores, especialmente em carnes e modelos de conservação de produtos
28 (LEE; HENDRICKS, 1995; STODOLAK *et al.*, 2007; FILGUEIRAS *et al.*, 2009).

29 Os efeitos protetivos do IP6 em diferentes doenças estão relacionados à sua
30 ação antioxidante pela quelação com o ferro, supressão da formação de radicais livres
31 de oxigênio e quelação com Ca^{2+} . Estudos evidenciaram sua ação em inibir a
32 peroxidação lipídica no cólon de suínos (PORRES *et al.*, 1999), afetando a atividade
33 da glutathiona peroxidase e da catalase. Além disso, o IP6 modula as funções do
34 sistema imune, aumentando a atividade das células *natural killer*, regulando a ação

1 dos neutrófilos e diminuindo a expressão de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias
2 (CHOLEWA *et al.*, 2008). Além disso, inibição de agregação plaquetária (VUCENIK,
3 *et al.* 1999), redução de lipídios (ONOMI; OKAZAKI; KATAYAMA, 2004), prevenção
4 de doenças cardiovasculares (GRASES *et al.*, 2006), bem como um efeito protetor nas
5 doenças neurodegenerativas (ANEKONDA *et al.*, 2011). Em estudos *in vitro* (KAPRAL
6 *et al.*, 2012) e em modelos animais *in vivo* (KHATIWADA *et al.*, 2011) descreveram
7 uma diminuição do desenvolvimento de vários tipos de câncer. Estudos prévios *ex*
8 *vivo* (SILVA *et al.*, 2014) demonstraram efeitos protetores do IP6 sobre as alterações
9 morfológicas induzidas pelas micotoxinas no intestino.

11 2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

12
13
14 O organismo possui um complexo sistema de proteção antioxidante, como
15 mecanismo de defesa contra os radicais livres, que são formados constantemente no
16 metabolismo celular normal e em vários eventos patológicos e, quando em excesso,
17 podem ocasionar a oxidação de moléculas biológicas. O desequilíbrio entre o desafio
18 oxidativo e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é denominado de
19 estresse oxidativo (MACHADO *et al.*, 2009).

20 Com o metabolismo do oxigênio e nitrogênio várias moléculas tóxicas,
21 conhecidas como espécies reativas são produzidas (BARREIROS *et al.*, 2006).
22 Qualquer organismo que utilize o oxigênio ou nitrogênio durante a respiração celular
23 na quebra de aminoácidos da dieta para obtenção de energia, estão passíveis de se
24 encontrar em estresse oxidativo (FERREIRA; ABREU, 2007). A produção de espécies
25 reativas de oxigênio (ERO) está elevada nas lesões teciduais causadas por traumas,
26 infecções, parasitas, radiações, hipóxia, toxinas e exercícios extremos sendo que
27 trabalhos demonstram que a ação dessas espécies na homeostase celular pode ser
28 primária ou secundária ao desenvolvimento de enfermidades devido ao efeito
29 cumulativo das lesões celulares produzidas nessas condições (CURTIS,2013; SILVA
30 *et al.*, 2013; RUSSO; BRACARENSE, 2016).

31 Existem no organismo, alguns mecanismos para a proteção contra essas
32 substâncias, porém, em algumas condições esses mecanismos não são suficientes e
33 acabam ocasionando danos em tecidos (DA SILVA, 2014). Em pequena quantidade
34 são benéficos e algumas vezes indispensáveis, contudo, em altas concentrações
35 podem ser tóxicos, sobretudo ao oxidarem moléculas biológicas alterando suas

1 características e provocando transtornos no metabolismo celular (CHIHUAILAF *et al.*,
2 2002). O excesso de radicais livres no organismo é combatido pelos antioxidantes
3 produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta (BARREIROS *et al.*, 2006; CAMPOS;
4 LEME, 2018) e podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente
5 em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou
6 previne significativamente a sua oxidação (HALLIWELL *et al.*, 2000).

7 Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar o dano oxidativo celular,
8 formação de espécies radicais e mecanismos antioxidantes intracelulares. A maioria
9 dos ensaios utilizados avalia o estresse oxidativo e envolve a medição de glutathione
10 reduzida (GSH) e peroxidação lipídica [nível de malondialdeído (MDA)] (SCHAFER;
11 BUETTER, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Para aferição indireta das ERO
12 (espécies reativas ao metabolismo do oxigênio) e, conseqüentemente, das lesões
13 oxidativas são os espectrofotométricos e cromatométricos, que medem a atividade
14 enzimática de superóxido desmutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-
15 Px) e glutathione redutase (GSH-Rd) e/ou a concentração de tripeptídeos (GSH,
16 GSSG) e aldeídos (MDA). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e
17 outros fluidos. A lipoperoxidação de membranas é habitualmente monitorada pelo
18 método do MDA (malonaldeído), conhecido como TBARS (substâncias reativas ao
19 ácido tiobarbitúrico) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

20 O ensaio FRAP ("Ferric-Reducing Ability of Plasma") testa a força
21 antioxidante baseada no fato de que a habilidade de um composto em produzir Fe^{2+}
22 a partir de Fe^{3+} define sua força antioxidante e o ensaio TEAC ("Trolox Equivalent
23 Antioxidant Capacity") ou teste do ABTS baseia-se na inibição por antioxidantes do
24 cátion radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio) que
25 apresenta absorvância característica primária em 415 nm e absorções secundárias
26 em 660, 734 e 820 nm (RE *et al.*, 1999; PRIOR *et al.*, 2003).

27 A determinação dessas substâncias revela-se de grande importância, pois o
28 entendimento dos mecanismos utilizados pelas células para a manutenção do balanço
29 *redox* do meio é fundamental na identificação de biomarcadores representativos para
30 a avaliação do nível de estresse oxidativo de diferentes indivíduos. Nessa perspectiva,
31 pesquisas aliando esses marcadores e novos desenvolvimentos de ferramentas e
32 métodos analíticos que possibilitem uma avaliação de forma menos invasiva, sensível,
33 rápida e simples, com janelas de detecção cada vez menores, vêm assumindo um
34 papel relevante no avanço da investigação. A intoxicação por fumonisina em suínos e

1 a utilização de altas doses de acetaminofeno podem comprometer a funcionalidade
2 do fígado devido a hepatotoxicidade. A utilização de técnicas laboratoriais como o
3 modelo *ex vivo* permite elucidar os mecanismos de ação dessas substâncias sob o
4 organismo, auxiliando na normatização de limites máximos e na prevenção das
5 intoxicações e lesões.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

3 REFERÊNCIAS

AMARAL, S.S.; OLIVEIRA, A.G.; MARQUES, P.E.; QUINTÃO, J.L.; PIRES, D.A.; RESENDE, R.R.; SOUSA, B.R.; MELGAÇO, J.G.; PINTO, M.A.; RUSSO, R.C.; GOMES, A.K.; ANDRADE, L.M.; ZANIN, R.F.; PEREIRA, R.V.; BONORINO, C.; SORIANI, F.M.; LIMA, C.X.; CARA, D.C.; TEIXEIRA, M.M.; LEITE, M.F.; MENEZES, G.B. Altered responsiveness to extracellular ATP enhances acetaminophen hepatotoxicity. **Cell Communication Signalling**, v.11, n.10, 2013.

ANDERSSON, B. S. *et al.* N-acetyl-p-benzoquinone imine-induced changes in the energy metabolism in hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, v.75, n.2, p. 201-211, 1990.

ANEKONDA, T, S.; WADSWORTH, T.L.; SABIN, R.; FRAHLER, K.; HARRIS, C.; PETRIKOL, B.; RALLE, M.; WOLTJER, R.; QUINN, J. F. Phytic acid as a potential treatment for Alzheimer's pathology: evidence from animal and in vitro models. **Journal of Alzheimers Diseases**, v. 23, n.1, p. 21-35, 2011.

ANVISA. Resolução RCD nº59 (26 de dezembro de 2013). Disponível: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0007_18_02_2011_rep.html. Acessado em: 15 de janeiro de 2020.

BALLS, M. Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. **Laboratory Animals**, v. 28, p. 193-211, 1994.

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.; LABRUYE, R.E. An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytic* pathogenesis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, New York, v. 3, n. 11, p. 1-11, 2009.

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

BASSO, K.M.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Tissue explants: a model rediscovered in animal experiments. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3951-3958, 2013.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K.C. Toxins in filamentous fungi. In:____ BREITENBACH, M.; CRAMERI, R.; LEHRER, S.B (Eds.). Fungal Allergy and Pathogenicity. **Chemical Immunology**, v.81, p.167-206, 2002.

BIANCHI, M.D.; OLIVEIRA, C.A.F; ALBUQUERQUE, R.; GUERRA, J.L.; CORREA, B. Effects of prolonged oral administration of aflatoxin B1 and Fumonisin B1 in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 84, p. 1835-1840, 2005.

- 1 BRUNS, D. H.; ARTWOHL, J.; BROELSCH, C.; KREMER, B. Acetaminophen-induced
2 acute hepatic failure in pigs: controversial results to other animal models. **Research**
3 **in Experimental Medicine**, Berlim, v.188, n. p.463–472, 1988.
4
- 5 CALDAS, E. D.; SILVA, A. C. S. Mycotoxins in corn-based food products consumed in
6 Brazil: an exposure assessment for fumonisins. **Journal of Agriculture Food**
7 **Chemical**, v. 55, p. 7974–7980, 2007.
8
- 9 CAMPOS, M. T.; LEME, F. O. P. Estresse oxidativo: fisiopatogenia e diagnóstico
10 laboratorial. **Pubvet, Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 12, n. 1, p. 1-8, 2018.
11
- 12 CAST, Council of Agricultural Science and Technology Mycotoxins: Risks in plant,
13 animal, and human systems. **Task Force Report**, n.139, 199 p, 2003.
14
- 15 CASTEEL, S.W.; TURK, J.R.; COWART, RP, ROTTINGHAUS, G.E. Chronic toxicity
16 of fumonisin in weanling pigs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**,
17 Davis, v.5, n, p.413-417, 1993.
18
- 19 CASTEEL, S.W.; TURK, J.R.; ROTTINGHAUS, G.E. Chronic effects of dietary
20 fumonisin on the heart and pulmonar vasculature of swine. **Fundamental and Applied**
21 **Toxicology**, Orlando, v.23, n. p.518-524, 1994.
22
- 23 CHAN, C. Y. *et al.* Reactive Metabolite-induced Protein Glutathionylation: a Potentially
24 Novel Mechanism Underlying Acetaminophen Hepatotoxicity. **Molecular & Cellular**
25 **Proteomics**, v.17, n.8, p. 1-57, 2018.
26
- 27 CHIHUAILAF, R.H.; CONTRERAS, P.A.; WITTWER, F.G. Pathogenesis of oxidative
28 stress: consequences and evaluation in animal health. **Veterinary Mexico**, México,
29 v.33, p.265-283, 2002.
30
- 31 CHOLEWA, K. *et al.* The influence of phytic acid on TNF-alpha and it receptor genes
32 expression in colon cancer Caco-2 cells. **Acta Polonia e Pharmaceutica**, v. 65, p. 75-
33 79, 2008.
34
- 35 CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe.
36 **Toxicology Letters**, v. 127, n. p. 19-28, 2002.
37
- 38 CURTIS, A. O. **Parâmetro de estresse oxidativo em cães naturalmente infectados**
39 **pelo vírus da cinomose**. *Medicina Veterinária*. Universidade Federal de Santa Maria,
40 Santa Maria – Rio Grande do Sul. 2013.
41
- 42 DA SILVA, E.O.; GEREZ, J.R.; DRAPE, T.C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Phytic acid
43 decreases desoxynivalenol and fumonisin B1-induced changes on swine jejunal
44 explants. **Toxicology Reports**, v.1, n.1, p. 284-292, 2014.
45
- 46 DAHLIN D.C. *et al.* N-Acetyl-p-benzoquinone imine; a cytochrome P-450-mediated
47 oxidation product of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of**
48 **Sciences USA**, v. 81, n. 5, p.1327-133, 1984.

- 1 DILKIN, P.; HASSEGAWA, R.; REIS, T. A.; MALLMANN, C. A.; CORRÊA, B.
2 Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.
3 34, n. 1, p. 175-181, 2004.
4
- 5 DILKIN, P.; DIREITO, G.; SIMAS, M.M.S.; MALLMANN, C.A.; CORRÊA, B.
6 Toxicokinetics and toxicological effects of single oral dose of fumonisina B1 containing
7 *Fusarium verticillioides* culture material in weaned piglets. **Chemico-Biological**
8 **Interactions**, v. 185, p.157-16, 2010.
9
- 10 DILKIN, P.; MALLMANN, C. A. Mycotoxin and mycotoxicosis in swine. Tradução de
11 Gabriela Zaviezo M. A. **Lamic**. 183p. 2011.
12
- 13 DROUGAS, J. G.; BERNARD, S. E.; WRIGHT, J. K.; SIKI, M.; LOPEZ, R. R.;
14 STOKES, K. A.; WILLIAMS, P. E.; PINSON, C. W. A model for the extended studies of
15 hepatic hemodynamics and metabolism in swine. **Laboratory Animal Science**, Braga,
16 v. 46, n. 6, p. 648- 655, 1996.
17
- 18 EMPSON, K. L.; LABUZA, T. P.; GRAF, E.; **Journal Food Science**, p.56, 560, 1991.
19
- 20 FELL, H. B.; ROBISON, R. The development and phosphatase activity *in vivo* and *in*
21 *vitro* of the mandibular skeletal tissue of the embryonic fowl. **Biochemical Journal**,
22 Londres, v. 24, n. 6, p. 1905-1921, 1930.
23
- 24 FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças
25 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação**
26 **Médica Brasileira**, v.43, n.1, 1997.
27
- 28 FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. Estresse oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos,
29 **Bioanálise**, n.1, p.32-39, 2007.
30
- 31 FILGUEIRAS, C. T.; CASAGRANDE, R.; SOARES, A. L., SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E.
32 I. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química**
33 **Nova**, v.32, n.7, p.1787-1791, 2009.
34
- 35 FLECKNELL, P.A. Refinement of animal use – assessment and alleviation of pain and
36 distress. **Laboratory Animals**, v. 28, p. 222-231, 1994.
37
- 38 FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F; MENDES, F. N. P. Micotoxinas:
39 importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: **Embrapa**
40 **Agroindústria Tropical**, 2007. 48 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documento,
41 110).
42
- 43 FREITAS, B. V.; KOIYAMA, N. T. G.; LIMA, M. M.SANTOS, M. T. V.; FILARDI, R.S.;
44 ARAÚJO, L. F. Utilização de fitase na dieta de suínos em crescimento: viabilidade
45 técnica e econômica e características ósseas. **Anais**..Pirassununga: FMVZ-USP,
46 2013.

- 1 GHIRETTI, G. P. *et al.* Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano
2 and mortadella production. **Meat Science**, v.47, n. 1-2, p.167-176, 1997.
- 3
- 4 GONZALEZ, F.H.D, SILVA, S.C. **Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária**. 2^a
5 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.v. 8, p. 318-
6 337, 2006.
- 7
- 8 GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology &**
9 **Medicine**, v. 8, n.1, p.61-69, 1990.
- 10
- 11 GRASES, F.; SANCHIS, P.; PERELLO, J.; ISERN, B.; PRIETO, R.M.; FERNANDEZ-
12 PALOMEQUE, C.; FIOL, M.; BONNIN, O.; TORRES, J.J. Phytate (myo-inositol
13 hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. **Frontier in Bioscience**,
14 v.1, n.11, p.136-142, 2006.
- 15
- 16 GRENIER, B.; BRACARENSE, A.P.L.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G.D.; COSSALTER,
17 A.M.; MOLL, W.D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I.P. **Molecular Nutrition and Food**
18 **Research**, v. 55, p. 761-771, 2011.
- 19
- 20 GRUBER-DORNINGER, C.; JENKINS, T.; SCHATZMAYR, G. Global mycotoxin
21 occurrence in feed: a ten-year survey. **Toxins**, v.27, n.7, p. 375, 2019.
- 22
- 23 GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H. M.; METGES, C. C. Nutritional
24 programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man?
25 **Nutrition Research Reviews**, Germany, v. 23, n. 1, p. 4-22, 2010.
- 26
- 27 GUYTON A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**, 9^a ed., Guanabara Koogan, Rio de
28 Janeiro, c. 70, p. 672, 1997.
- 29
- 30 HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human
31 body. **Febs Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.
- 32
- 33 HASCHEK, W.M., MOTELIN, G., NESS, D.K.; HARLIN, K.S.; VESONDER, R.F.;
34 PETERSON, R. E.; BEASLEY, V. R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and
35 intravenously dosed swine. **Mycopathology**, v.117, n. 1, p. 83-96, 1992.
- 36
- 37 HASCHEK, W.M.; GUMPRECHT, L.A., SMITH, G.; TUMBLESON, M.E.;
38 CONSTABLE, P.D. Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary
39 edema and current perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v.109, p. 251-
40 257, 2001.
- 41
- 42 HE, Y.Y., ZHANG B.X., JIA F.L. Protective effects of 2,4-dihydroxybenzophenone
43 against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **World Journal of**
44 **Gastroenterology**, v. 17, n.21, p.2663-2666, 2011.
- 45

- 1 JONGBLOED, A.W.; KEMME, P.A.; MROZ, Z. The role of microbial phytases in pig
2 production, In: ENZYMES IN ANIMAL PRODUCTION, 1993, Kartause Ittingen.
3 **Proceedings...**, Kartause Ittingen, Switzerland, p.173-180,1993.
4
- 5 JUNIOR E.V.M. Situações que favorecem ou reduzem a hepatotoxicidade pelo
6 acetaminofem. **Revista Suplemento Hepatotoxicidade**, v.30, n.1, p. 06-47, 2011.
7
- 8 KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. **Clinical Biochemistry of Domestic**
9 **Animals**. Academic Press, 1997, 5ª edição, 932 p.
- 10 KANORA, A.; MAES D. The role of mycotoxins in pig reproduction: a review.
11 **Veterinary Medicine**, v.54, p. 565-576, 2009.
12
- 13 KAPRAL, M.; WAWSZCZYK, J., JURZAK, M., HOLLEK, A., WEGLARZ, L. The effect
14 of inositol six phosphate on the expression of selected metalloproteinases and their
15 tissue inhibitors in IL- 1 β -simulated colon cancer cells. **International Journal of**
16 **Colorectal Disease**, v.27, n.11, p.1419-1428, 2012.
17
- 18 KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Incidência de fumonisina b1, aflatoxina B1, B2,
19 G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia**
20 **de Alimentos**, v. 26, p. 516-521, 2006.
- 21 KHATIWADA, J.; VERGHESE, M.; DAVIS, S.; WILLIAMS, L.L. Green tea, phytic acid,
22 and inositol in combination reduced the incidence of azoxymethane-induced colon
23 tumor in fisher 344 male rats. **Journal of Medicinal Food**, v.14, n.11, p.1313-1320,
24 2011.
- 25 KIES, A.K.; DE JONGE, L.H.; KEMME, P.A. et al. Interaction between protein, phytate,
26 and microbial phytase. In vitro studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,
27 v.54, p.1753—1758, 2006.
28
- 29 KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.;
30 RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Development of a pig jejunal
31 explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin
32 deoxynivalenol: histopathological analysis. **Toxicology in Vitro**, v.23, n.8, p. 1580-
33 1584, 2009.
34
- 35 LEE, B.J.; HENDRICKS, D.G. Phytic acid protective effect against beef round muscle
36 lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 2, p. 241-244, 1995.
37
- 38 LINDER, M.C. Nutrition and metabolism of the trace elements. In: LINDER, M.C.
39 Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications. 2ª Ed.. New York:
40 **Elsevier Science**, Cap.7, p. 215-276, 1991.
41
- 42 LOLAS, G.M.; PALAMIDIS, N.; MARKAKIS, P. The phytic acid-total phosphorus
43 relation in barley, oats, soybeans and wheat. **Cereal Chemistry Journal**, v.53, n.6,
44 p.867- 871, 1976.
45

- 1 MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. da;
2 YONEZAWA, L. A. Lesão oxidativa eritrocitária e mecanismos antioxidantes de
3 interesse em Medicina Veterinária. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 1,
4 p. 84-94, 2009.
5
- 6 MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia
7 associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B1. **Revista de**
8 **Microbiologia**, v.30, n.3, p. 249-252, 1999.
9
- 10 MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxícoses. IN: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS,
11 D. (Ed). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Cãnone editorial, p. 487- 509, 2007.
12
- 13 MATHUR, S.; CONSTABLE, P. D.; EPPLEY, R. M.; WAGGONER, A. L.;
14 TUMBLESON, M. E.; HASCHER, W. M. Fumonisin B1 is hepatotoxic and nephrotoxic
15 in milk-fed calves. **Toxicology Science**, v.60, p. 385-396, 2001.
16
- 17 MAZRAATI, P.; MINAIYAN, M. "Hepatoprotective Effect of Metadoxine on
18 Acetaminophen-Induced Liver Toxicity in Mice". **Advanced Biomedical Research**,
19 v. 7, n.67, 2018.
20
- 21 MERRILL, A.H., VAN ECHTEN, G., WANG, E.; SANDHOFF, K. Fumonisin B1 inhibits
22 sphingosine (sphinganine) N - acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis
23 in cultured neuron in situ. **Journal of Biological Chemistry**, v.268, p.2299-2306,
24 1993.
25
- 26 MOSS, M.O. Economic importance of mycotoxins-recent incidence in the United
27 States. **Animal Science**, v.27, n. p. 3941- 3949, 1991.
28
- 29 MOTELIN, G.K.; HASCHEK, W.M.; NESS, D.K.; HALL, W.F.; HARLIN, K. S.;
30 SCHAEFFER, D. J.; BEASLEY, V. R. Temporal and dose response features in swine
31 fed corn screenings contaminated with fumonisin mycotoxins. **Mycopathology**, v. 126,
32 n.1, p. 27-40, 1994.
33
- 34 MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize – Can we reduce their
35 occurrence? **Plant Disease**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.
36
- 37 ONOMI, S.; OKAZAKI, Y.; KATAYAMA, T. Effect of dietary level of phytic acid on
38 hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. **Bioscience,**
39 **Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n.6, p.1379-1381, 2004.
40
- 41 OSWEILER, G.D., ROSS, P.F., WILSON, T.M.; NELSON, P.E.; WITTE, S. T.;
42 CARSON, T. L.; RICE, R. G.; NELSON, H. A. Characterization of an epizootic of
43 pulmonary edema in swine in corn screening. **Journal of Veterinary Diagnostic**
44 **Investigation**, v.4, n. p.53-59, 1992.
45
- 46 PACHECO, D.G. **Efeitos do ácido fítico dietético e da enzima fitase em suínos na**
47 **fase de terminação e ação do ácido fítico sobre a integridade epitelial das células**

- 1 **IPEC-1.** 127 F. Tese (Doutorado em Ciência Animal), Londrina - Universidade
2 Estadual de Londrina, 2010.
- 3
- 4 PLAAMI, S. Myoinositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition.
5 **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 30, p. 633-647, 1997.
- 6
- 7 PRELUSKY, D.B. *et al.* Biological fate of fumonisin B1 in food-producing animals.
8 **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v.392, p.265-278,
9 1996.
- 10
- 11 PORRES, J.M. *et al.* Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in
12 pigs with a moderately high dietary iron intake. **Proceedings of the Society for**
13 **Experimental Biology and Medicine**, v. 221, p. 80-86, 1999.
- 14
- 15 POZZI, C.R.; ARCARO, J.R.P.; ARCARO J.R.I.; FAGUNDES, H.; CORREA, B.
16 Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismos de ação de fumonisin. **Ciência**
17 **Rural**, v. 32, p. 901-907, 2002.
- 18
- 19 PRIOR, R. L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.;
20 HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R.; J. Assays for hydrophilic
21 and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC (FL))
22 of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food**
23 **Chemistry**, v.51, n. 11, p. 3273 - 3279, 2003.
- 24 RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue:
25 a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, London, v. 27,
26 n. 4, p. 267- 284, 2011.
- 27 RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-
28 EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation
29 decolorization assay. **Free Radical Biology e Medicine**, v.26, n. 9/10, p. 1231-
30 1237,1999.
- 31
- 32 RILLEY, R.T.; HINTON, D. M.; CHAMBERLAIN, W. J.; BACON, C. W.; WANG, E.;
33 MERRILL, A.H. Jr.; VOSS, K.A. Dietary fumonisin B1 induces disruption of sphingolipid
34 metabolism in Sprague-Dawley rats: a new mechanism of nephrotoxicity. **Journal of**
35 **Nutrition**, v. 124, n. p. 594- 603, 1994.
- 36
- 37 RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; SABINO, M.; Pesquisa em micotoxinas no Brasil: a última
38 década em foco. **Brazilian Journal Microbiology**, São Paulo, n 33, p. 1-11, 2002.
- 39
- 40 ROSTAGNO, H.S.; SILVA, M.A. Exigências nutricionais e biodisponibilidade de
41 fósforo para frangos de corte. In: Simpósio internacional sobre nutrição de aves,
42 **Anais**, Campinas: CBNA, p. 1-27, 1998.
- 43
- 44 RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. 1959. **The Principles of Humane Experimental**
45 **Technique**. Disponível em: <[https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-](https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique)
46 [humane-experimental-technique](https://caat.jhsph.edu/principles/the-principles-of-humane-experimental-technique)> Acesso: setembro de 2019.
- 47

- 1 RUSSO, C.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Oxidative stress in dogs. **Semina: Ciências**
2 **Agrárias**, v. 37, p. 1431-1440, 2016.
- 3
- 4 SANTIN, E.; MAIORKA, A.; ZANELLA, I.; MAGON, L. Micotoxinas do *Fusarium* spp
5 na avicultura comercial. **Ciência Rural**, v.31, n.1, p.185- 190, 2000.
- 6
- 7 SANTURIO, J.M. Micotoxinas e Micotoxicoses na Avicultura. **Revista Brasileira de**
8 **Ciência Avícola**, v.2, n.1, p.01-12, 2000.
- 9
- 10 SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through
11 the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology**
12 **Medicine**, v.30, n. 11, p.1191-1212, 2001.
- 13
- 14 SCHECHTMAN, L. M. Implementation of the 3Rs (Refinement, reduction, and
15 replacement): Validation and regulatory acceptance considerations for alternative
16 toxicological test methods. **ILAR Journal**, v. 43, supl, p. S85-S94, 2002.
- 17
- 18 SCOTT, P.M. Fumonisin. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p. 257-
19 270, 1993.
- 20
- 21 SEBEN V.C., LUGOCH R.W., SCHLINKER C.S., ARBO M.D., VIANNA R.L.
22 Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica
23 do paracetamol. **Revista Brasileira de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, n.2,
24 p.143-148, 2010.
- 25
- 26 SELLE, P. H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed**
27 **Science and Technology**, v. 135, n. p.1–41, 2007.
- 28
- 29 SIMÕES, A. O porco: animal sócio cultural total. **Mneme – Revista de Humanidades**,
30 Caicó (RN), v.4, n.9, p, 44-64, 2004.
- 31
- 32 SILVA, A. C. R. A., ALMEIDA, B. F. M., SOEIRO, C. S., FERREIRA, W. L., LIMA, V.
33 M. F. & CIARLINI, P. C. Estresse oxidativo e aumento da apoptose em neutrófilos de
34 cães com azotemia pré-renal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
35 **Zootecnia**,v. 65, n. p.163-170, 2013.
- 36
- 37 STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and
38 mechanisms of action of fumonisin B₁. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, p.
39 799- 809, 2008.
- 40
- 41 STODOLAK, B.; STARZÝNSKA, A.; CZYSZCZOŃ, M.; ŻYLA, K. The effect of phytic
42 acid on antioxidant stability of raw and cooked meat. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p.
43 1041-1045, 2007.
- 44
- 45 SWINDLE, M. M.; SMITH, A. C. Comparative and physiology of the pig. **Scandinavian**
46 **Journal of Laboratory Animal Science**, Escandinávia, v. 25, p. 11- 21, 1998.
47 Supplement 1

- 1 TARANU, I.; MARIN, D.E.; BOUHET, S.; OSWALD, I.P. Effect of fumonisin on the pig.
2 Mycotoxins in Farm Animals. **Transworld Research Network publisher**, ISBN: 978-
3 81-7895-312-0, Trivandrum-695 023, KERALA. 2008.
- 4
- 5 THRALL M.A. *et. al.* **Hematologia e Bioquímica Clínica Veterinária**, 2^a ed.,
6 Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 349 a 360, 2015.
- 7
- 8 TURNER, P. C.; NIKIEMA, P.; WILD, C. P. Fumonisin contamination of food: progress
9 in development of biomarkers to better assess human health risks. **Mutation**
10 **Research**, Amsterdam, v.443, p.81-93, 1999.
- 11
- 12 VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.;
13 BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio,
14 antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos
15 analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, 2007.
- 16
- 17 VATS, P.; BANERJEE, U.C. Production studies and catalytic properties of phytases
18 (myo-inositolhexakisphosphate phosphohydrolases): an overview. **Enzyme and**
19 **Microbial Technology**, v.35, n.1, p.3-14, 2004.
- 20
- 21 VITORINO, O. C. L. **Micotoxinas na Alimentação e na saúde animal e humana**.
22 Dissertação - Mestrado em Engenharia Zootécnica. Universidade de Açores. 2011.
- 23
- 24 VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; FILMORE, I.M.; HOWARD,
25 P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER, J.K. An overview
26 of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisinas and *Fusarium moniliforme*.
27 **Environmental Health Perspectives**, v. 109, suppl. 2, p. 259-266, 2001.
- 28
- 29 VOSS, K. A.; HOWARD, P.C.; RILEY, R.T.; SHARMA, R.P.; BUCCI, T.J.;
30 LORENTZEN, R.J. Carcinogenicity and mechanism of action of fumonisin B1: a
31 mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* (=F. verticillioides). **Cancer Detection**
32 **and Prevention**, v.26, p. 1–9, 2002.
- 33
- 34 VUCENIK, I.; PODECZASY, J.J.; SHAMSUDDIN, A.M. Antiplatelet activity of inositol
35 hexaposphate (IP6). **Anticancer Research**, v.19, n.5, p.3689-3693, 1999.
- 36
- 37 VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.M. Protection against cancer by dietary IP6 and
38 Inositol. **Nutrition and Cancer**, v. 55, p. 109-125, 2006.
- 39
- 40 XIMÉNEZ, C.; GONZÁLES, E.; NIEVES, M.; MAGAÑA, U.; MORÁN, P.; GUDIÑO-
41 ZAYAS, M.; PARTIDA, O.; HERNÁNDEZ, E.; ROJAS-VELÁSQUEZ, L.; de LEÓN,
42 M.C.G.; MALDONADO, H. Differential expression of pathogenic genes of *Entamoeba*
43 *histolytica* vs *E. dispar* in a model of infection using human liver tissue explants. **Plos**
44 **one**, v. 12, n.8, p. 1-22, 2017.
- 45
- 46 YAZAR, S.; OMURTAG, G.Z. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals.
47 **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, p. 2062-2090, 2008.
- 48

- 1 WANG, E., NORRED, W.P., BACON, C.W., RILEY, R.T.; MERRILL, A. H. Jr. Inhibition
2 of sphingolipid biosynthesis by fumonisins implications for diseases associated with
3 *Fusarium moniliforme*. **Journal of Biological Chemistry's**, v.266, p.1486-1490, 1991.
4
- 5 WANG, E.; ROSS, P. F.; WILSON, T.M., RILEY, R.T.; MERRILL, A.H. Jr. Increases in
6 serum sphingosine and sphinganine and decreases in complex sphingolipids in
7 ponies, given, feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium*
8 *moniliforme*. **Nutrition: Toxicology and Pharmacology**, v.122, p.1706-1716, 1992.
9
- 10 WANG, E.; RILEY, R.T.; MEREDITH, F.I.; MERRILL, A.H.Jr. Fumonisin B1
11 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary
12 sphinganine and sphingosine. **Journal of Nutrition**, v.129, p. 214-220, 1999.
13
- 14 WESTHUIZEN, L. V. D.; BROWN, N. L.; MARASAS, W. F. O.; SWANEVELDER, S.;
15 SHEPARD, G. S. Sphinganine/Sphingosine ratio in plasma and urine as a possible
16 biomarker for fumonisin exposure in humans in rural areas of Africa. **Food and**
17 **Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1153-1158, 1999.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

1 4 HIPÓTESES

2

3

- O modelo *ex vivo* hepático pode ser utilizado como uma alternativa viável dentro do princípio 3Rs da experimentação animal.

4

5

- A fumonisina B₁ e o acetaminofeno causam alterações/lesões nos explantes hepáticos.

6

7

- A adição de ácido fítico modula as lesões causadas pela fumonisina B₁ e o acetaminofeno.

8

9

1 5 OBJETIVOS

2

3 5.1 OBJETIVO GERAL

4

- 5 • Avaliar os efeitos do ácido fítico (IP6) na hepatotoxicidade produzida pela
6 fumonisina B₁ (FB₁) ou acetaminofeno em um modelo *ex vivo* hepático de
7 leitões e suínos de terminação por meio de atividade enzimática, substâncias
8 que indicam função, escore histopatológico e resposta ao estresse oxidativo.

9

10 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

11

- 12 • Padronizar o modelo de explante para avaliação toxicológica hepática;
- 13 • Caracterizar histologicamente alterações induzidas pela FB₁ e acetaminofeno
14 nos explantes;
- 15 • Avaliar a resposta ao estresse oxidativo após exposição à FB₁ e
16 acetaminofeno;
- 17 • Verificar a eficiência da mensuração de biomarcadores no sobrenadante obtido
18 do meio de cultura como método diagnóstico de lesão, colestase e função
19 hepática;
- 20 • Avaliar os efeitos do IP6 nos explantes submetidos aos tratamentos com FB₁ e
21 acetaminofeno;
- 22 • Avaliar os achados histopatológicos, bioquímicos e de resposta ao estresse
23 oxidativo em explantes de suínos de diferentes faixas etárias.

24

6 ARTIGO I

Artigo a ser submetido para a revista *Food and Chemical Toxicology*
ISSN: 0278-6915 – Fator de Impacto: 3.775

Hepatotoxicidade do acetaminofeno em explantes hepáticos de suínos: avaliação dos biomarcadores de integridade celular, sistema biliar, síntese, escore histopatológico e capacidade antioxidante

Nadia Cristine Weinert^{1,2}, Ana Paula Frederico R. L. Bracarense^{2*}

¹ Universidade Estadual do Centro Oeste – Unicentro. Email: nadiaweinert@hotmail.com

² Laboratório de Patologia Animal; Universidade Estadual de Londrina - UEL, Paraná 86057-970, Brasil;

*e-mail: ana.bracarense@pq.cnpq.br

Resumo: Culturas de tecido de suínos na forma de explantes têm sido utilizadas com sucesso na avaliação de diferentes substâncias, possibilitando a realização de diversos tratamentos simultâneos, de forma rápida e baixo custo. Objetivou-se padronizar um modelo *ex vivo* para avaliar os efeitos da exposição ao acetaminofeno e ácido fítico (IP6). Explantes hepáticos de nove suínos (120 dias) (GE1) e seis suínos (40 dias) (GE2) foram avaliados e classificados de acordo com um escore lesional histológico, biomarcadores hepáticos e resposta ao estresse oxidativo. Os explantes foram divididos em cinco tratamentos: controle 0h (imediatamente fixado em formol 10%); controle 4h (Ctrl 4 h); IP6 (5mM); grupo exposto ao acetaminofeno (20mM) e acetaminofeno + IP6, durante quatro horas a 37° C. Realizou-se nos tempos de 1/2, 2 e 4 horas, a mensuração dos indicadores de lesão hepática, colestase e função. Para o GE1, na presença de IP6, observou-se menor atividade enzimática de FA e GGT, e para o GE2, apenas de GGT, em relação ao controle ($p \leq 0,05$). Explantes expostos ao acetaminofeno apresentaram redução significativa da atividade de FA, AST, ALT, PT e colesterol em comparação ao controle. Para o GE2, notou-se uma queda significativa na atividade de FA e ALT no grupo acetaminofeno mais IP6 em relação ao controle. Os explantes incubados apenas com meio de cultura (Ctrl 4 h) apresentaram aspectos histológicos similares aos não incubados (Ctrl 0h). Não houve diferença significativa no escore lesional histológico entre os tratamentos nos explantes oriundos do GE1 e GE2. Diminuição significativa nos níveis de TBARS e aumento nos níveis de ABTS e FRAP foi observada nos explantes expostos (GE1) ao acetaminofeno em relação ao controle. No GE2 observou-se aumento significativo nos níveis de NBT e nos níveis de GSH, FRAP e ABTS no grupo acetaminofeno em relação ao controle. Portanto, os resultados indicam que o modelo foi adequado para a avaliação experimental. A exposição à agentes tóxicos é frequente e afeta a saúde animal e humana, portanto o desenvolvimento de mecanismos que reduzam os efeitos tóxicos contribui de modo significativo com a saúde única.

Palavras-chave: acetaminofeno; ácido fítico; fígado.

Abstract: Swine tissue cultures in the form of explants have been used successfully in different substances, allowing the realization of several simultaneous uses, quickly and low. Objective: to standardize an *ex vivo* model to assess the effects of exposure to acetaminophen and phytic acid (IP6). Hepatic explants of nine pigs (120 days-old) (GE1) and six pigs (40 days-old) (GE2) were evaluated and classified according to a lesional histological history, liver biomarkers and response to oxidative stress. The explants were divided into five controls: 0h control (activated

1 fixed on the 10% form); control 4h (Ctrl 4h); IP6 (5mM); group exposed to acetaminophen
2 (20mM) and acetaminophen + IP6, for four hours at 37° C. Performed in 1/2, 2 and 4 hours, the
3 measurement of liver injury, cholestasis and function indicators. For GE1, in the presence of
4 IP6, decrease the lower enzyme activity of FA and GGT, and for GE2, only of GGT, compared
5 to the control ($p \leq 0.05$). Explants exposed to acetaminophen, significantly reducing the activity
6 of FA, AST, ALT, PT and cholesterol compared to control. For GE2, there is no significant
7 probability of AF and ALT activity in the acetaminophen group plus IP6 compared to the
8 control. The explants incubated only with culture media (Ctrl 4h) presented similar historical
9 aspects to those not incubated (Ctrl 0h). There was no significant difference in the histological
10 score between procedures on explants from GE1 and GE2. Significant decrease in TBARS
11 levels and increase in ABTS and FRAP levels were observed in the explants exposed (GE1) to
12 acetaminophen in relation to the control. No GE2 significantly reduced the levels of NBT and
13 GSH, FRAP and ABTS in the acetaminophen group compared to the control. Therefore, the
14 results that the model was suitable for an experimental evaluation. Exposure to toxic agents is
15 frequent and affects animal and human health, therefore, the development of mechanisms that
16 reduce toxic effects contributes a significant effect on unique health.

17
18 **Key words:** acetaminophen; phytic acid; liver.

19 20 **1 INTRODUÇÃO**

21
22 O fígado atua de forma direta no armazenamento e degradação de substâncias,
23 hormônios e participa da síntese e secreção de sais biliares, além de promover a regulação dos
24 carboidratos, proteínas e lipídeos. Devido às inúmeras e relevantes funções que o fígado
25 desempenha de forma direta e indireta no organismo, foram desenvolvidas várias técnicas para
26 mensurar o desempenho, bem como apontar possíveis lesões neste órgão (GUYTON, 1997).

27 O modelo *ex vivo*, caracteriza-se pelo cultivo de fragmentos de órgãos que são colhidos
28 e posteriormente incubados em placas com meio de cultura em temperatura semelhante à
29 corpórea, simulando as condições de um organismo vivo (RANDALL; TURTON; FOSTER,
30 2011). A metodologia dos explantes também proporciona a possibilidade de colher várias
31 amostras de um único doador, aumentando assim a confiabilidade estatística da investigação e
32 reduzindo o número de animais utilizados (KOLF-CLAUW *et al.*, 2009). Explantes de tecidos
33 de suínos têm sido muito utilizados na experimentação animal e uma das finalidades é a
34 observação dos efeitos tóxicos de certas substâncias (BASSO, 2013). Ximénez *et al.* (2017)
35 empregaram um modelo hepático *ex vivo* humano para avaliar a expressão diferencial de genes
36 patogênicos de *Entamoeba histolytica* x *E. dispar* e a interação hospedeiro-parasita (incluindo
37 a resposta imune humana).

38 O acetaminofeno é um princípio ativo que possui ação analgésica e antipirética
39 (DAHLIN, 1984). A metabolização ocorre no fígado, mais especificamente no retículo
40 endoplasmático liso dos hepatócitos. Este órgão auxilia na depuração de componentes tóxicos
41 que possam vir a causar danos, apresentando uma função detoxificante (BANDEIRA, 2017).

1 As vias predominantes da biotransformação de acetaminofeno no fígado são a formação
2 direta de conjugados com o ácido glicurônico e com o sulfato, chamadas de glicuronidação e
3 sulfatação resultando em conjugados inativos atóxicos excretados na urina e na bile
4 (MANYIKE, 2000). Porém, quando o acetaminofeno encontra-se em concentrações elevadas,
5 essas vias se saturam e o princípio ativo passa a sofrer o processo de oxidação mais importante
6 do fígado pelo citocromo P450, formando N-acetil-p-benzoquinona imina (NAPQI), que é um
7 metabólito tóxico para o organismo (ANDERSSON, 1990). Entretanto, o organismo tenta
8 compensar esse desbalanço e conjuga esse metabólito com a glutathiona, porém um dos
9 principais motivos da intoxicação é a diminuição significativa da glutathiona, pois também
10 ocorre a saturação dessa via (MAZRAATI, 2018). Por consequência, o NAPQI pode reagir
11 com as macromoléculas celulares do fígado causando as lesões por toxicidade, sendo a enzima
12 CYP2E1 a principal fonte para o metabolismo oxidativo do acetaminofeno, sendo então o
13 estresse oxidativo conhecido como um dos mecanismos que induz lesão por esse princípio ativo
14 (CHAN *et al.*, 2018). Desta forma, devido ao dano dos lipídios, proteínas da membrana, DNA
15 e carboidratos, ocorrem os distúrbios metabólicos e celulares (MACHADO *et al.*, 2009).

16 A característica bioquímica mais relevante da toxicidade por acetaminofeno é o alto
17 nível de aminotransferases (MAZRAATI, 2018). Atividade enzimática de aspartato
18 aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) são sempre elevadas por
19 consequência de uma exposição a doses altas desse princípio ativo.

20 O ácido fítico (IP6) é um antioxidante vegetal natural, que pode ser encontrado na
21 maioria dos grãos, sementes e feijões e é uma forma utilizada pelas plantas para o
22 armazenamento de fósforo, capaz de inibir a formação de radicais livres (GHIRETTI, 1997).
23 Pelo mesmo mecanismo o ácido fítico pode diminuir a incidência de câncer e proteger contra
24 algumas doenças inflamatórias (GRAF, 1990). Em adição, efeitos protetores foram associados
25 à redução da peroxidação lipídica (DA SILVA, 2014).

26 Levando em consideração os fatores supramencionados, o objetivo desse estudo foi
27 estabelecer um modelo *ex vivo* para caracterizar alterações estruturais e funcionais hepáticas,
28 por meio da utilização do acetaminofeno e ácido fítico.

29 30 **2 MATERIAL E MÉTODOS**

31
32
33 Nove suínos em fase de terminação (120 dias) oriundos de frigoríficos da região de
34 Londrina, estado do Paraná, com serviço de inspeção federal (SIF) foram alocados no grupo
35 experimental 1 (GE1) e seis leitões com aproximadamente 40 dias no grupo experimental 2

1 (GE2). Os animais do GE1 foram abatidos após insensibilização por eletrocussão seguida de
2 exsanguinação, já os animais do GE2 foram eutanasiados (acepromazina 1%, 40mg/kg de
3 pentobarbital de sódio e KCl 15%). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela
4 comissão de ética no uso em animais (CEUA 15-2019). Todos os animais estavam clinicamente
5 saudáveis. Para o GE1 foram colhidos 165 explantes hepáticos e estes divididos em três grupos:
6 controle 4 horas (Ctrl 4h), grupo exposto ácido fítico (5mM) e grupo exposto ao acetaminofeno
7 (20mM). Para o GE2 foram colhidos 147 explantes, além do acréscimo de um quarto grupo
8 exposto ao acetaminofeno (20mM) mais ácido fítico (5mM). Estes explantes foram mantidos
9 incubados durante 4 horas na presença de uma solução de meio de cultura (Dulbecco Modified
10 Eagle Medium - DMEM) suplementado com penicilina-estreptomicina (1%), L-glutamina, 3,7g
11 de NaHCO₃ e soro fetal bovino, para posteriormente serem fixados em formol a 10%.
12 Adicionalmente foram colhidos explantes que não foram incubados para análise histológica e
13 comparação com o controle incubado por 4 horas. O acetaminofeno foi utilizado como possível
14 indutor de lesão hepática.

15

16 *2.1 Colheita dos explantes*

17

18 No ambiente do fluxo laminar foi realizado a colheita dos explantes com auxílio de
19 navalha estéril de micrótomo, depositando os fragmentos nas placas de 6 poços contendo uma
20 cama de 1 ml de ágar-ágar sobreposta por 5 mL de meio de cultura DMEM. Dois explantes
21 foram cultivados por poço, de forma que em cada placa foram incubados 12 explantes.

22

23 *2.2 Incubação dos explantes*

24

25 Logo após a colheita, as placas contendo os explantes foram mantidas em agitação
26 vertical dentro de uma estufa a 37°C durante o período de quatro horas. No tempo de trinta
27 minutos, duas e quatro horas de incubação o material era retirado da estufa e em capela de fluxo
28 laminar eram aliquotados 200 µL do sobrenadante de cada poço, sendo este fracionado em
29 quatro tubos *eppendorf* contendo 50 µL do sobrenadante que foram utilizados para
30 quantificação dos biomarcadores hepáticos. Após o período de incubação de quatro horas,
31 exceto o controle 0 horas (0h) que foi imediatamente fixado após a coleta, os explantes foram
32 retirados da estufa e então foram transferidos para uma solução de formol a 10%.

33

2.3 Avaliação dos biomarcadores de lesão, colestase e função hepática

Na avaliação laboratorial foram realizadas as mensurações das atividades enzimáticas: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST); colestase: fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamilttransferase (GGT) e função hepática: colesterol e proteínas totais com intuito de determinar a extensão da hepatotoxicidade possivelmente causada pelo acetaminofeno. O teste cinético de alta sensibilidade foi empregado para mensurar as atividades enzimáticas (ALT, AST, FA e GGT) e o colorimétrico para colesterol e proteína total, utilizando equipamento automático Dimension Clinical Chemistry System® (Siemens, Alemanha) conforme técnica padronizada pelo fabricante no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina.

2.4 Avaliação histopatológica

Os fragmentos fixados em solução de formol neutro a 10%, tamponado com fosfato, 0,01 M pH 7,4 e mantidos em álcool 70% até o processamento, foram processados seguindo técnicas de rotina sendo corados em hematoxilina-eosina (HE) e então os fragmentos foram analisados por meio de microscopia óptica de acordo com sete critérios (desorganização trabecular, degeneração vacuolar citoplasmática, degeneração vacuolar nuclear, infiltrado inflamatório, megalocitose celular, apoptose e necrose) que foram pontuados conforme a gravidade da lesão: zero (0) para tecidos sem alteração, um (01) para alterações discretas, dois (02) para alterações moderadas e três (03) para alterações graves.

2.5 Estresse oxidativo

As amostras de fígado coletadas foram congeladas a -80°C . As amostras congeladas foram processadas e homogeneizadas com 500 μl de KCl (1,15%), depois centrifugadas (200 x g, 10 min, 4°C) e a capacidade antioxidante total do fígado, no sobrenadante resultante, foi avaliada pelos ensaios potencial de capacidade de redução do ferro (FRAP), redução da glutathiona (GSH) e capacidade de eliminação de radicais livres (ABTS) (HOHMANN *et al.*, 2013).

Para a determinação da resposta oxidativa foram realizados os ensaios de redução do tetrazólio de nitroazul (NBT) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (HOHMANN *et al.*, 2013; FATTORI *et al.*, 2017).

2.6 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o *software* Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011). Os dados submetidos a análise estatística foram representados como média \pm desvio padrão. Os biomarcadores hepáticos foram analisados por meio de ANOVA fatorial, seguido pelo teste de Tukey assim como o efeito dos tratamentos na resposta oxidativa (GSH, FRAP, ABTS, NBT e TBARS) foram analisados pelo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p \leq 0,05$), utilizando o *software* estatístico *GraphPad Prism* 6.01 (*GraphPad Software Inc.*, La Jolla, CA, 38 USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os biomarcadores hepáticos, avaliou-se primeiramente a atividade enzimática indicadora de lesão hepática e colestase, seguida de análise da função do fígado. Para a atividade enzimática, observou-se efeito significativo dos tratamentos independentemente do tempo de incubação para lesão (ALT e AST), colestase (FA e GGT), assim como para função (proteína total e colesterol), no sobrenadante obtido dos explantes de suínos de terminação (GE1) (Tabela 1). Não foi observada interação entre os tempos estudados em cada tratamento analisado (Tabela 3). Na presença de IP6, foram observados atividade enzimática significativamente menor para a enzima GGT (12,20%) e FA (19,34%) em relação ao grupo controle ($p = 0,03$; $p \leq 0,0001$). Quando o acetaminofeno foi adicionado ao meio de cultura, a atividade de FA (7,4%; $p \leq 0,0001$), AST (17,16%; $p = 0,03$), ALT (59,94%; $p \leq 0,0001$), PT (11,47%; $p = 0,02$) e colesterol (10,19%; $p = 0,0002$) diminuíram significativamente em comparação com o controle (Tabela 1).

Tabela 1 – Efeito do tratamento independentemente do tempo nos parâmetros bioquímicos do sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de suínos de terminação (GE1) expostos ao meio de cultura (Controle); ácido fítico (IP6) e 20 mM de acetaminofeno (Acet)^{a)}.

	Controle	IP6	Acet.
FA UI/L	38,04±5,10a	33,40±4,13 b	35,20±2,83 b
GGT UI/L	12,77±5,22a	10,30±4,82b	11,42±2,12ab
AST UI/L	963,10±216,05a	909,5±265,95 ab	797,80±310,70b
ALT UI/L	56,74±29,87a	60,18±34,24a	22,73±11,79b
PT g/dL	0,61±0,08a	0,60±0,08a	0,54±0,08b
Colesterol g/dL	4,12±0,33a	4,07±0,26a	3,70±0,42b

a) Os resultados são expressos como média ± DP. ^{a, b} letra minúscula diferente indica significância estatística entre tratamentos independentemente do tempo pela ANOVA fatorial seguida pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$. FA - fosfatase alcalina; GGT – γ - glutamiltransferase; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase; PT- proteína total; Trat – tratamento.

Para os leitões (GE2), também não foi observada interação entre os tempos estudados em cada momento analisado (Tabela 4), porém observou-se um efeito significativo do tratamento nas atividades de FA, AST e ALT ($p = 0,0002$; $p = 0,0002$; $p \leq 0,0001$, respectivamente) (Tabela 2). IP6 induziu uma redução significativa de 17,87% na atividade de FA em comparação com o tratamento controle ($p = 0,001$). Da mesma forma que o GE1, com acetaminofeno diminuiu significativamente, FA (11,86%), AST (27,48%) e ALT (37,66%) em comparação ao grupo controle ($p = 0,04$; $p = 0,001$; $p < 0,0001$, respectivamente). Além disso, foi observada uma queda significativa de FA (18,71%) e ALT (36,02%) no grupo acetaminofeno acrescido de IP6 em relação às amostras controle, respectivamente ($p = 0,0005$; $p \leq 0,0001$).

1 **Tabela 2** - Efeito do tratamento independentemente do tempo nos parâmetros bioquímicos do
 2 sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de leitões (GE2) expostos ao meio de cultura
 3 (Controle); ácido fítico (IP6); 20 mM de acetaminofeno (Acet) e Acet (20mM) mais IP6
 4 (5mM)^{a)}.

	Controle	IP6	Acet.	Acet.+IP6
FA UI/L	41,57±5,34 a	34,14±5,17 b	36,64±6,48 b	33,79±4,92 b
GGT UI/L	11,91±1,94 a	11,72±1,95 a	11,30±1,99 a	11,63±1,74 a
AST UI/L	596,35±203,77 a	617,32±221,05 a	432,42±121,59 b	562,18±190,72 a
ALT UI/L	19,57±6,40 a	19,61±6,30 a	12,20±3,63 b	12,52±4,30 b
PT g/dL	0,50±0,04 a	0,47±0,07 a	0,48±0,05 a	0,48±0,06 a
Coolesterol g/dL	20,76±5,31 a	20,67±5,37 a	20,65±5,41 a	23,02±0,08 a

5 ^{a)} Os resultados são expressos como média ± DP. ^{a, b} letra minúscula diferente indica significância estatística
 6 entre tratamentos independentemente do tempo pela ANOVA fatorial seguida pelo teste de Tukey $p \leq 0,05$.
 7 FA - fosfatase alcalina; GGT - γ - glutamiltransferase; AST - aspartato aminotransferase; ALT - alanina
 8 aminotransferase; PT- proteína total; Trat - tratamento.
 9

10
 11 Esses dados diferem substancialmente daqueles encontrados na literatura, nos quais esse
 12 princípio ativo (acetaminofeno) leva ao aumento significativo das transaminases (ALT e AST)
 13 em altas doses *in vivo* (McGILL, 2012, VLIEGENTHART *et al.*, 2015). O fator tempo pode ter
 14 contribuído com a não elevação das atividades enzimáticas, já que para Larson *et al.* (2005),
 15 em geral, a lesão provocada pelo acetaminofeno no fígado surge 12-72 horas após a ingestão,
 16 sendo que no presente estudo a exposição foi de quatro horas.

17 Para modelos *ex vivo*, não há dados sobre dose hepatotóxica, assim utilizou-se 20 mM
 18 referente a um estudo *in vitro* que utilizou esta dose em fígados de camundongos
 19 (AMARAL *et al.*, 2013). A dose de 20mM foi equivalente a 2351,37 mg/kg de acordo com a
 20 densidade e pureza de 98% do acetaminofeno no meio de cultura. As doses de 1000 - 2000
 21 mg/kg administradas em suínos (*in vivo*) demonstraram intoxicação, levando ao óbito de alguns
 22 animais devido a formação de metahemoglobinemia (BRUNS *et al.*, 1988) sendo que a utilizada
 23 neste trabalho, encontra-se dentro dos valores tóxicos para a espécie.

24 A redução da atividade enzimática no sobrenadante dos explantes expostos ao
 25 acetaminofeno de ambos os grupos (GE1 e GE2) pode ser justificada pela ação anti-inflamatória
 26 do fármaco que inibe a cicloxigenase-2 (COX-2), diminuindo a permeabilidade celular
 27 (SPINOSA; SCHWARZ, 2008). Outra hipótese, pode estar relacionada ao mecanismo de ação
 28 do fármaco, que pode atuar na célula por vias distintas chamadas de glicuronidação e sulfatação,
 29 em que correspondem a aproximadamente 60% e 30% da sua metabolização no fígado,

1 respectivamente, podendo resultar na produção de metabólitos atóxicos pela catalisação por
2 enzimas específicas (McGILL, 2013). As vias que provavelmente foram induzidas, são
3 responsáveis pela diminuição ou não alteração das enzimas de lesão hepática, já que o tempo
4 utilizado para incubação é relativamente curto e essas são as vias primárias da metabolização
5 (MANYIKE, 2000).

6

1 **Tabela 3** - Efeito do tratamento dependente do tempo nos parâmetros bioquímicos no sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de suínos de
 2 terminação (GE1) expostos ao meio de cultura (Controle); ácido fítico (IP6), 20 mM de acetaminofeno (Acet) e Acet (20mM) mais IP6 (5mM). ^{a)}

	30 minutos			2 horas			4 horas			Tratamento			Valor de p		
	CTRL	IP6	Acet	CTRL	IP6	Acet	CTRL	IP6	Acet	CTRL	IP6	Acet	Trat ²	Tempo	Trat* Tempo
FA	38,00±	34,52±	36,06±3,3	36,96±	33,32±	35,72±	39,14±	32,36±	33,91±	38,04±	33,40±	35,20±	<0.0001	0,56	0,44
UI/L	5,99	3,27	8	4,36	2,87	2,15	4,96	5,68	2,71	5,10a	4,13 b	2,83 b			
GGT	11,18±	10,50±	10,33±	13,82±	10,82±	12,17±	13,30±	9,51±	11,76±	12,77±	10,30±	11,42±	0,03	0,28	0,71
UI/L	3,50	3,84	2,44	7,0	4,80	1,46	4,47	3,66	2,12	5,22a	4,82b	2,12ab			
AST	931,71±	894,89±	609,11±	1084,29±1	1031,93±2	897,56±	873,3±	801,61±	886,69±	963,10±	909,5±	797,80±	0,03	0,003	0,13
UI/L	206,48	235,52	245,47	61,06	10,09	264,47	230,40	307,51	351,28	216,05 a	265,95 ab	310,70 b			
ALT	36,25±	37,20±	19,00±	57,21±	60,00±	20,28±	76,76±	83,34±	28,91±	56,74±	60,18±	22,73±	<0,0001	<0,0001	0,17
UI/L	16,62	17,32	11,55	22,57	31,60	10,70	33,83	35,39	11,79	29,87 a	34,24 a	11,79 b			
PT	0,54±	0,58±	0,51±	0,63±	0,58±	0,58±	0,65±	0,64±	0,57±	0,61±	0,60±	0,54±	0,02	0,0003	0,17
g/dL	0,06	0,09	0,08	0,06	0,09	0,07	0,08	0,06	0,10	0,08 a	0,08 a	0,08 b			
Col	4,07±	4,07±	3,89±	4,21±	4,07±	3,78±	4,07±	4,07±	3,67±	4,12±	4,07±	3,70±	0,0002	0,51	0,64
g/dL	0,27	0,27	0,33	0,43	0,27	0,44	0,27	0,27	0,50	0,33 a	0,26 a	0,42 b			

3

4

5

6 **Tabela 4** - Efeito do tratamento dependente do tempo nos parâmetros bioquímicos no sobrenadante da cultura de explantes hepáticos de leitões
 7 (GE2) expostos ao meio de cultura (Controle – CTRL); Ácido fítico (IP6); 20mM de acetaminofeno (Acet.) e Acet. (20mM) mais IP6 (5mM). ^{a)}

	30 minutos				2 horas				4 horas				Tratamento				Valor de p		
	CTRL	IP6	Acet	Acet+ IP6	CTRL	IP6	Acet	Acet+ IP6	CTRL	IP6	Acet	Acet+ IP6	CTRL	IP6	Acet	Acet+ IP6	Trat ²	Tempo	Trat* Tempo
FA	41,65±	36,40±	37,67±	35,55±	41,8±	34,55±	37,77±	35,38±	41,18±	33,73±	34,50±	30,45±	41,57±	34,14±	36,64±	33,79±	0,0002	0,06	0,93
UI/L	5,91	4,41	7,04	4,22	5,82	5,30	5,96	4,61	5,28	8,27	7,03	4,81	5,34 a	5,17 b	6,48 b	4,92 b			
GGT	10,57±	10,60±	10,78±	11,10±1	11,6±	11,83±	11,05±	12,22±	13,55±	12,75±	12,05±	11,57±	11,91±	11,72±	11,30±	11,63±	0,78	0,007	0,57
UI/L	0,96	1,43	1,66	,24	1,39	1,43	2,17	2,32	2,11	2,48	2,24	1,61	1,94 a	1,95 a	1,99 a	1,74 a			
AST	352,23	385,28±	317,55	426,38±	647,07	644,10±	490,55	613,73±	789,77±	822,17±	489,15±	646,43±	596,35±	617,32±	432,42±	562,18±	0,0002	<0,0001	0,08
UI/L	±57,18	68,90	±43,15	232,9	±75,65	122,48	±93,76	126,79	112,70	174,26	125,94	139,72	203,77 a	221,05 a	121,59 b	190,72 a			
ALT	13,67±	14,33±	10,17±	11,43±	20,0±	20,00±	13,67±	12,00±	25,00±	24,50±	13,50±	14,12±	19,57±	19,61±	12,20±	12,52±	<0,0001	<0,0001	0,17
UI/L	3,19	4,24	2,41	5,85	4,72	4,12	3,83	1,51	5,41	6,14	4,32	4,63	6,40 a	6,30 a	3,63 b	4,30 b			
PT	0,47±	0,42±	0,47±	0,43±	0,52±	0,50±	0,50±	0,50±	0,50±	0,52±	0,47±	0,50±	0,50±	0,47±	0,48±	0,48±	0,74	0,0008	0,47
g/dL	0,05	0,07	0,05	0,05	0,04	0,06	0,00	0,06	0,06	0,04	0,05	0,06	0,04 a	0,07 a	0,05 a	0,06 a			
Col	20,78±	20,67±	20,67±	23,00±0	20,67±	20,67±	20,62±	23,05±	20,83±	20,67±	20,67±	23,00±	20,76±	20,67±	20,65±	23,02±	0,40	0,99	>0,99
g/dL	5,43	5,72	5,71	,00	5,71	5,71	5,84	0,12	5,81	5,71	5,71	0,00	5,31 a	5,37 a	5,41 a	0,08 a			

8 ^{a)} Os resultados são expressos como média ± DP. ^{a, b} letra minúscula diferente indica significância estatística entre tratamentos independentemente do tempo pela ANOVA
 9 fatorial seguida pelo teste de Tukey p≤0,05. FA - fosfatase alcalina; GGT – γ - glutamiltransferase; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase; PT-
 10 proteína total; Col – colesterol; Trat – tratamento.

1 Os explantes incubados apenas com meio de cultura durante quatro horas (Ctrl 4 horas)
2 apresentaram aspectos histológicos similares aos explantes não incubados (Ctrl 0 horas). O
3 escore lesional médio nos suínos de terminação foi de $0,56 \pm 0,70$ e $0,94 \pm 0,68$ para o grupo
4 Ctrl 0h e Ctrl 4h, respectivamente. Nos leitões o escore de lesão no grupo 0h foi $2,72 \pm 1,67$ e
5 no grupo controle 4h, $2,08 \pm 1,31$. Em ambas as idades os explantes incubados apenas com o
6 meio de cultura (Ctrl 4h) apresentaram discretas alterações caracterizadas por vacuolização
7 citoplasmática (Figura 1). Os resultados indicam que a incubação dos explantes durante 4 horas
8 não interferiu na integridade do tecido hepático, sendo o modelo adequado para avaliação da
9 toxicidade.

10 Os principais achados histológicos nos explantes expostos ao acetaminofeno foram
11 infiltrado inflamatório mononuclear, vacuolização citoplasmática e megalocitose (Figura 1).
12 Não houve diferença significativa no escore de lesão entre os tratamentos, tanto nos animais de
13 terminação como nos leitões (Figura 1). Esses resultados diferem do descrito em ratos expostos
14 a uma única dose de paracetamol (200 mg/kg) em que degeneração hidrópica e necrose de
15 hepatócitos foram observadas (AHMAD *et al.*, 2019). O acetaminofeno é uma das principais
16 causas de lesão hepática em seres humanos e em modelos *in vivo*, sendo que a dose de
17 400mg/kg/10mL causou degeneração dos hepatócitos, dilatação dos capilares sinusoides,
18 infiltrado inflamatório e necrose em fígado de ratos (NIKRAVESH *et al.*, 2018). Em suínos,
19 uma superdosagem de acetaminofeno causa hepatotoxicidade devido à ação tóxica de seus
20 metabólitos (JAMES *et al.*, 2003), podendo levar a insuficiência hepática aguda na espécie
21 (LEE *et al.*, 2013; NEWSOME *et al.*, 2010).

22 O curto tempo de incubação ou a forma de exposição (contato direto) podem justificar
23 a diferença entre os resultados, pois a dose utilizada (2351,37 mg/kg), é considerada
24 hepatotóxica para a espécie suína (BRUNS *et al.*, 1988).

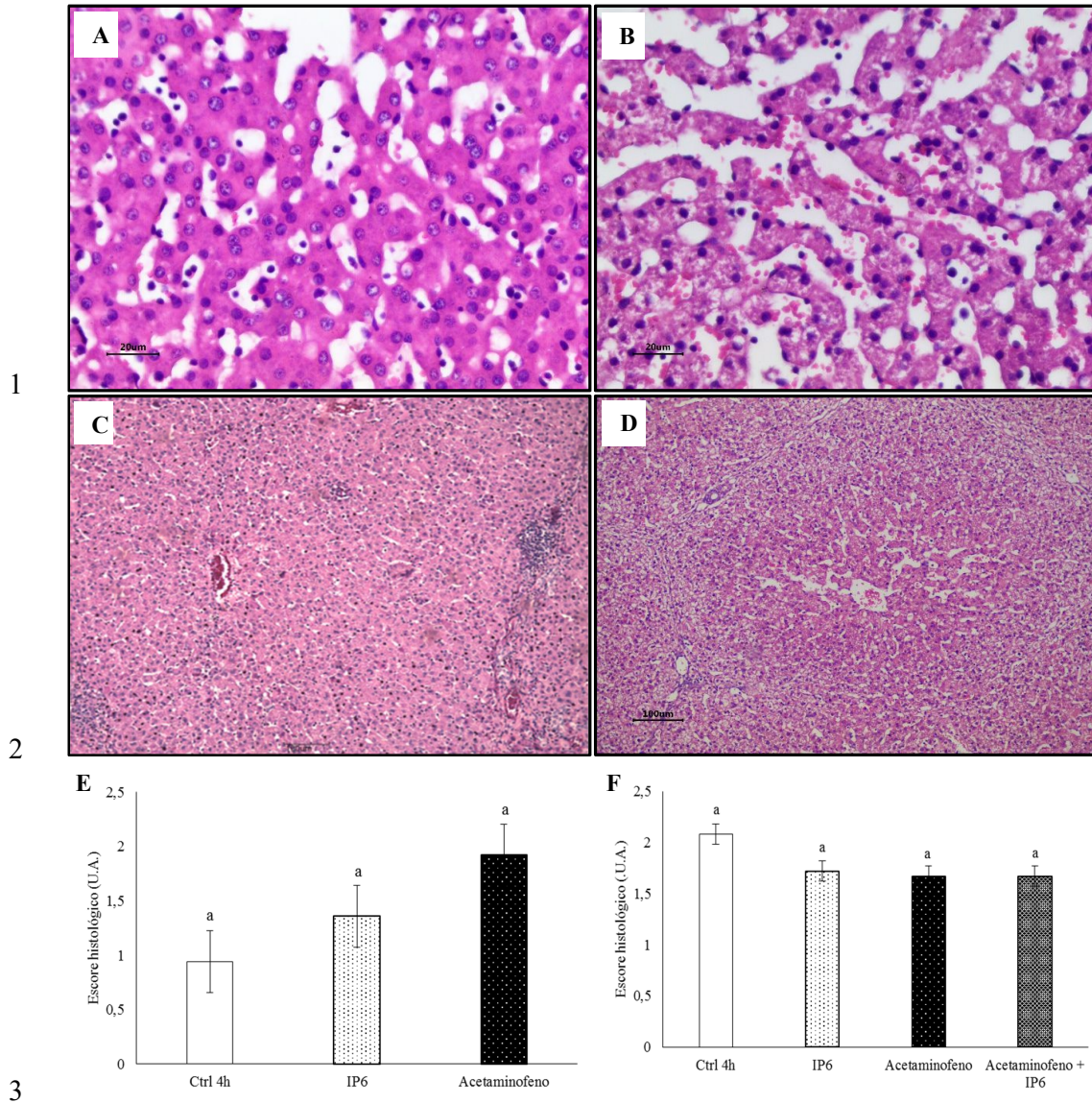
25 As médias obtidas no GE1 foram $0,94 \pm 0,68$; $1,36 \pm 1,32$ e $1,92 \pm 1,65$ para os grupos Ctrl
26 4h, IP6 e acetaminofeno, respectivamente. Para o GE2 os escores foram $2,08 \pm 1,31$; $1,72 \pm 0,96$;
27 $1,67 \pm 1,24$; $1,67 \pm 1,08$ para os grupos Ctrl 4h, IP6, acetaminofeno e acetaminofeno acrescido de
28 IP6, respectivamente ($p \geq 0,05$) (Figura 1).

29

30

31

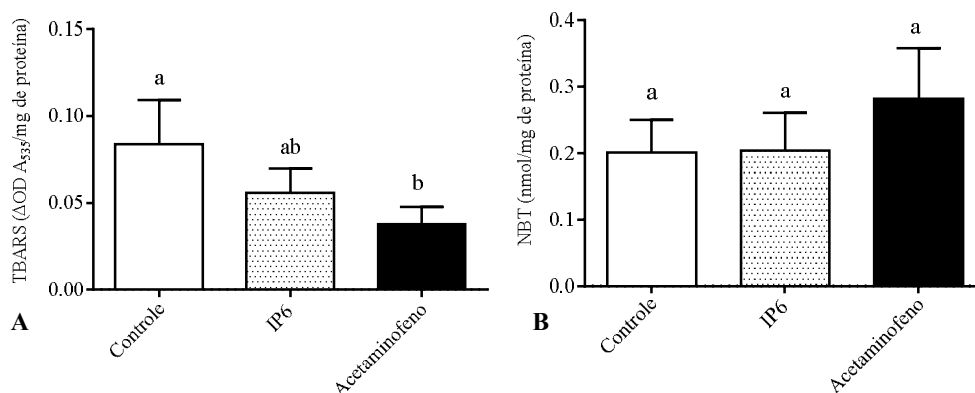
32



4 **Figura 1** – Efeitos do acetaminofeno e ácido fítico (IP6) em explantes hepáticos de suínos. A.
 5 Controle 4 horas. Morfologia hepática normal. HE. Barra 20 μ m. B. Grupo IP6. Observa-se
 6 discreta vacuolização citoplasmática. HE. Barra 20 μ m. C. Grupo acetaminofeno. Observa-se
 7 moderado infiltrado linfocitário periportal. HE. Barra 100 μ m. D. Grupo IP6+acetaminofeno
 8 (GE1). Observa-se discreta desorganização trabecular. HE. Barra 100 μ m. E. Escore médio de
 9 lesão em explantes hepáticos de suínos de terminação (GE1). F. Escore médio de lesão em
 10 explantes hepáticos de leitões (GE2).

11 ^a As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas barras não mostraram diferença significativa entre os
 12 tempos (teste de Tukey, 5% de probabilidade).

1 Na avaliação do estresse oxidativo no GE1 não houve diferença significativa entre os
 2 tratamentos no ensaio NBT ($p \geq 0,05$) (Figura 2). Quando há produção de ânion superóxido por
 3 fagócitos como macrófagos e neutrófilos é um passo crucial no estresse oxidativo levando à
 4 peroxidação lipídica e depleção dos sistemas antioxidantes endógenos gerais (HOHMANN *et al.*,
 5 2003). Adicionalmente, a concentração de TBARS no grupo acetaminofeno foi inferior ao grupo
 6 controle ($p \leq 0,05$), indicando que não houve aumento na formação de peróxidos lipídicos e,
 7 consequentemente, estresse oxidativo naqueles explantes.

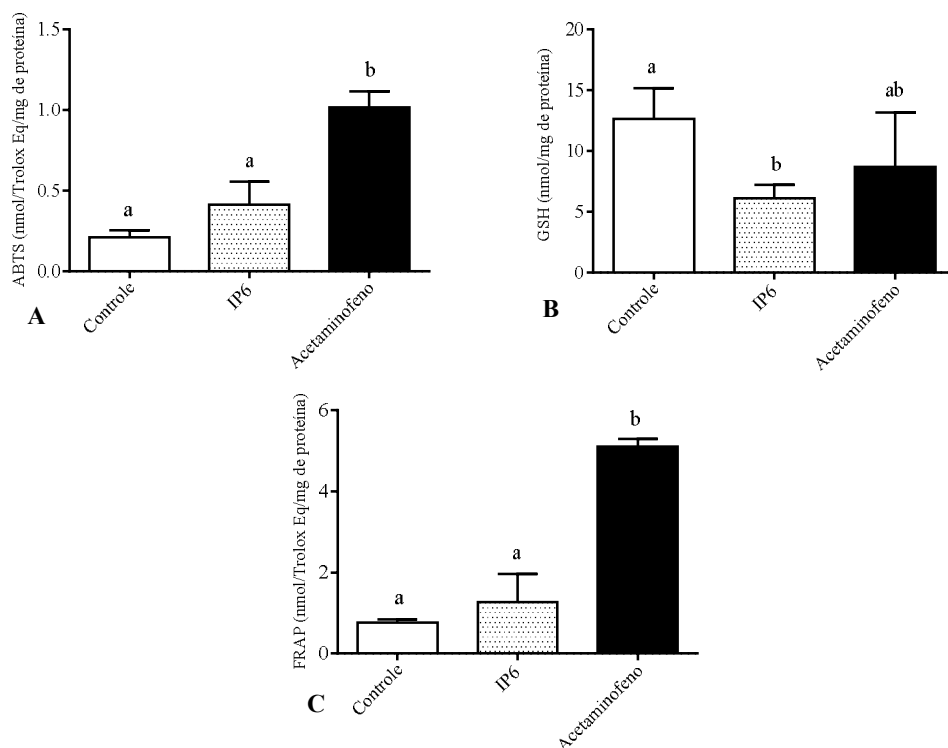


8
 9 **Figura 2** - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa
 10 hepática (GE1). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Peroxidação lipídica e
 11 produção de ânion superóxido. A. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). B.
 12 Tetrazólio de nitroazul (NBT).

13 ^{ab} As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas barras não mostraram diferença significativa entre os tempos
 14 (teste de Tukey, 5% de probabilidade).

15

16 Porém, ocorreu aumento da capacidade antioxidante (FRAP e ABTS) do grupo acetaminofeno
 17 comparado com controle 4h e IP6, sugerindo uma resposta tecidual exacerbada a determinado
 18 estímulo causado pelo princípio ativo utilizado, porém sem alterações morfológicas celulares. Houve
 19 uma redução do potencial antioxidante fisiológico da glutathiona reduzida (GSH) no grupo exposto ao
 20 IP6, que pode ser justificada pela atuação exógena deste antioxidante, poupando a liberação
 21 fisiológica. A lesão hepática aguda induzida por acetaminofeno é caracterizada por aumento da
 22 peroxidação de lipídios e diminuição do funcionamento de enzimas ou sistemas não enzimáticos de
 23 defesa antioxidante (EL-SHAFFEY *et al.*, 2015), ao contrário do que foi verificado neste estudo,
 24 exceto para a glutathiona reduzida (Figura 3).



1

2

3 **Figura 3** - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa
 4 hepática (GE1). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Defesa hepática antioxidante.
 5 A. Capacidade de eliminação de radicais livres (ABTS). B. Glutaciona reduzida (GSH). C. Potencial
 6 de redução do ferro (FRAP).

7 ^{ab} As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas barras não mostraram diferença significativa entre os tempos
 8 (teste de Tukey, 5% de probabilidade).

9

10 Já para o GE2 (Figura 4), em relação a toxicidade do acetaminofeno, não houve diferença para
 11 o ensaio TBARS, porém para o NBT ocorreu diferença entre o controle 4h e acetaminofeno, sendo
 12 maior para este último ($p = 0,0245$), além de diferença entre o tratamento IP6 ($p=0,0002$) e
 13 acetaminofeno acrescido de ácido fítico ($p= 0,0151$), com o tratamento acetaminofeno, sendo este
 14 superior do que ambos. Provavelmente ocorreu um estímulo de aumento de permeabilidade/lesão
 15 celular quando em contato com o acetaminofeno, pois é um fármaco que aumenta a peroxidação de
 16 lipídios em altas doses, podendo causar hepatotoxicidade (JÚNIOR, 2011; EL-SHAFFEY *et al.*, 2015).

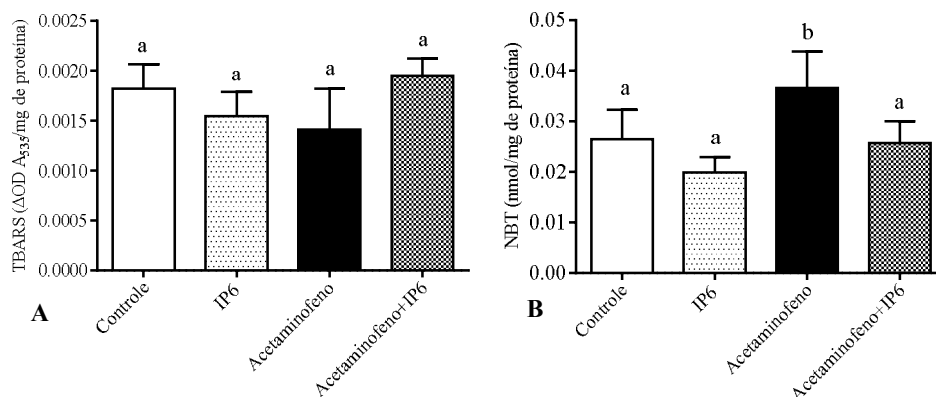


Figura 4 - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa hepática (GE2). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Peroxidação lipídica e produção de ânion superóxido. A. Substâncias reativas ao ácido tiobárburico (TBARS). B. Tetrazólio de nitroazul (NBT).

^{ab} As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas barras não mostraram diferença significativa entre os tempos (teste de Tukey, 5% de probabilidade).

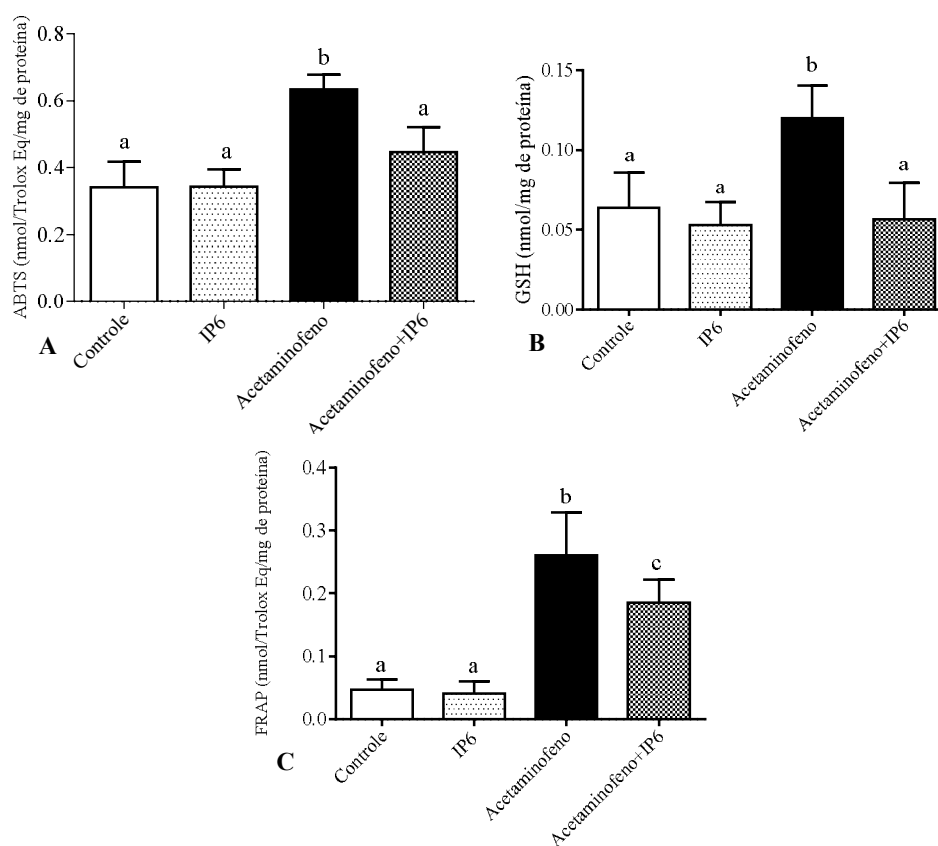
Houve aumento da capacidade antioxidante (GSH, FRAP e ABTS) do grupo acetaminofeno comparado com controle 4h, IP6 e acetaminofeno acrescido de ácido fítico, sugerindo uma resposta tecidual exacerbada a determinado estímulo causado pelo princípio ativo utilizado, porém sem alterações morfológicas celulares. Para o ensaio de GSH, houve diferença entre os grupos controle e acetaminofeno ($p=0,0122$), ácido fítico e acetaminofeno ($p=0,0045$) e acetaminofeno com acetaminofeno acrescido de ácido fítico ($p=0,0049$), sendo superior nos três casos, no grupo acetaminofeno (Figura 5).

Para a capacidade antioxidante total (ABTS), os grupos controle e ácido fítico diferiram com o grupo acetaminofeno ($p \leq 0,0001$), sendo superior os valores para este grupo, além deste direrir também do grupo acetaminofeno com ácido fítico ($p=0,0039$), sendo inferior para este último. No ensaio de redução de ferro (FRAP), ocorreu diferença entre todos os grupos ($p \leq 0,0001$), exceto para o controle e ácido fítico.

Como houve aumento da capacidade antioxidante hepática no GE2, pode-se inferir que leitões apresentam mecanismos de desintoxicação dependentes de glutathione, superior aos suínos terminação (GE1) que tiveram diminuição desta defesa antioxidante (EL-SHAFFEY *et al.*, 2015). Em crianças com idade inferior a 5 anos, foi comprovada menor susceptibilidade à hepatotoxicidade pelo acetaminofeno em decorrência da menor produção de NAPQI e em adultos ocorreu um aumento da metabolização pelo citocromo P450 (JUNIOR, 2011).

A glutathione é produzida pela própria célula hepática e é constituída pelos aminoácidos: glutamina, glicina e cisteína. Quando concentrações maiores de acetaminofeno são usadas, ocorre esgotamento da glutathione e o composto tóxico se acumula, resultando em dano hepático

1 (MÜHLBAUER, 2016) não observado no GE2. Estes achados, concordam com os valores obtidos
 2 pelas dosagens bioquímicas, indicando que provavelmente não houve alterações morfológicas
 3 relevantes nos hepatócitos expostos ao acetaminofeno, evidenciada pela intensa capacidade
 4 antioxidante, sendo que a L-glutamina suplementada no meio de cultura, pode ter contribuído com a
 5 formação de GSH, participando da desintoxicação dos metabólitos produzidos pelo acetaminofeno
 6 no fígado (TRUMPER, *et al.* 1996; MAZER; PERRONE, 2008). A glutamina é o aminoácido mais
 7 abundante no corpo e desempenha um papel central no crescimento e manutenção celular. Em cultura,
 8 células utilizam a glutamina em quantidades superiores a de qualquer outro aminoácido (CURI *et al.*,
 9 2005).



10

11

12 **Figura 5** - Efeitos do acetaminofeno (20mM) e ácido fítico (IP6) (5 mM) na resposta oxidativa
 13 hepática (GE2). Controle 4 horas; IP6 (5mM); Acetaminofeno (20mM). Defesa hepática antioxidante.
 14 A. Capacidade de eliminação de radicais livres (ABTS). B. Glutathiona reduzida (GSH). C. Potencial
 15 de redução do ferro (FRAP).

16 ^{ab} As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas barras não mostraram diferença significativa entre os tempos
 17 (teste de Tukey, 5% de probabilidade).

18

19 O tempo de incubação é um fator limitante do modelo. A incubação de tecidos com elevada
 20 metabolização por períodos superiores a quatro horas induz a perda da viabilidade tecidual decorrente
 21 da hipóxia prolongada (RANDALL; TURTON; FOSTER, 2011). O modelo utilizado mostrou-se
 22 adequado para avaliação de hepatotoxicidade, no entanto, são necessários mais estudos para

1 aprimorar o método, visando avaliar o tempo de incubação com a preservação da celularidade do
2 órgão.

3

4 **4 CONCLUSÃO**

5

6 Conclui-se que a técnica de explante hepático *ex vivo* é viável para avaliação de
7 hepatotoxicidade no período de incubação de quatro horas auxiliando na redução do número de
8 animais na experimentação. A similaridade anatômica e fisiológica do homem com a espécie suína,
9 faz com que estes resultados sejam relevantes. Porém, os mecanismos da lesão hepática induzida por
10 acetaminofeno são altamente complexos e muitos eventos intracelulares e extracelulares estão
11 envolvidos neste processo fisiopatológico, incluindo metabolismo do acetaminofeno, estresse
12 oxidativo mitocondrial, disfunção celular, inflamação, além da regeneração hepática, que ainda
13 precisam ser elucidados, principalmente entre diferentes faixas etárias. O pré-tratamento com
14 glutamina e o mecanismo dos efeitos protetores do ácido fólico ainda precisam ser melhor elucidados,
15 porém podem ser uma opção para prevenir danos funcionais e estruturais hepáticos promovidos pela
16 acetaminofeno.

17

18 **Limitações:** O fator tempo (4 horas) e o contato direto do acetaminofeno com o explante, sem o
19 cumprimento completo da farmacocinética, pode ter contribuído com a não elevação da atividade
20 enzimática no modelo. Porém é importante ressaltar que este fármaco, apesar da baixa capacidade
21 anti-inflamatória, é considerado um AINE, o que pode ter contribuído com o resultado obtido, além
22 de que as vias primárias de metabolização são consideradas atóxicas.

23 **Conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflito de interesse.

24 **Referências**

25

26 AHMAD, M.M.; REZK, N.A.; FAWZY, A.; SABRY, M. Protective effects of curcumin and
27 silymarin against paracetamol induced hepatotoxicity in adult male albino rats. **Gene**, v. 712: 143966,
28 2019.

29

30 AMARAL, S.S.; OLIVEIRA, A.G.; MARQUES, P.E.; QUINTÃO, J.L.; PIRES, D.A.; RESENDE,
31 R.R.; SOUSA, B.R.; MELGAÇO, J.G.; PINTO, M.A.; RUSSO, R.C.; GOMES, A.K.; ANDRADE,
32 L.M.; ZANIN, R.F.; PEREIRA, R.V.; BONORINO, C.; SORIANI, F.M.; LIMA, C.X.; CARA, D.C.;
33 TEIXEIRA, M.M.; LEITE, M.F.; MENEZES, G.B. Altered responsiveness to extracellular ATP
34 enhances acetaminophen hepatotoxicity. **Cell Communication Signalling**, v.11, n.10, 2013.

35

36 ANDERSSON, B. S. *et al.* N-acetyl-p-benzoquinone imine-induced changes in the energy
37 metabolism in hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions**, 75 (2):201-211, 1990.

38

39 BANDEIRA, A. C. B. **Avaliação do efeito protetor do licopeno em um modelo de**
40 **hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos C57BL/6**. 2017. 125 f. Tese

- 1 (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade
2 Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2017.
3
- 4 BASSO, K.M. *et al.* Tissue explants: a model rediscovered in animal experiments. **Semina: Ciências**
5 **Agrárias**, Londrina, 34(6) suplemento 2: 3951-3958, 2013.
6
- 7 BRUNS, D. H.; ARTWOHL, J.; BROELSCH, C.; KREMER, B. Acetaminophen-induced acute
8 hepatic failure in pigs: controversial results to other animal models. **Research in Experimental**
9 **Medicine**, Berlim, v.188, n. p.463–472, 1988.
10
- 11 CHAN, C. Y. *et al.* Reactive Metabolite-induced Protein Glutathionylation: a Potentially Novel Mechanism
12 Underlying Acetaminophen Hepatotoxicity. **Molecular & Cellular Proteomics**, 17 (8): 1-57, 2018.
13
- 14 CURI, R., LAGRANHA, C.J., DOI, S.Q., SELLITTI, D.F., PROCOPIO, J., PITHON-CURI, T.C., *et al.*
15 Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal Cell Physiology**, 204: 392-401, 2005.
16 DAHLIN D.C. *et al.* N-Acetyl-p-benzoquinone imine; a cytochrome P-450-mediated oxidation
17 product of acetaminophen. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 81(5): 1327-
18 133, 1984.
19
- 20 DA SILVA, E.O.; GEREZ, J.R.; DRAPE, T.C.; BRACARENSE, A.P.F.R.L. Phytic acid decreases
21 desoxynivalenol and fumonisin B1-induced changes on swine jejunal explants. **Toxicology Reports**,
22 1(1): 284-292, 2014.
23
- 24 EL-SHAFFEY, M.M.; ABD-ALLAH, G.M.; MOHAMADIN, A. M.; HARISA, G.I.; MARIEE, A.D.
25 Quercetin protects against acetaminophen-induced hepatorenal toxicity by reducing reactive oxygen
26 and nitrogen species, **Pathophysiology**, 22(1): 49-55, 2015.
27
- 28 FATTORI, V., BORGHI, S. M.; GUAZZELLI, C. F. S.; GIROLDO, A. C.; CRESSWINEIO, J.;
29 BUSSMANN, A. J. C.; COELHO-SILVA, L.; . LUDWIG, N. G.; MAZZUCO, T. L.;
30 CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A. Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury
31 through inhibition of oxidative stress, apoptosis, cytokine production, and NF-κB activation in mice.
32 **Pharmacological Research**, 120:10-22, 2017.
33
- 34 FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**,
35 35(6):1039-1042, 2011.
36
- 37 GHIRETTI, G. P. *et al.* Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and
38 mortadella production. **Meat Science**, 47(1-2): 167-176, 1997.
39
- 40 GRAF, E. *et al.* Antioxidant functions of phytic Acid. **Free Radical Biology & Medicine**, 8(1):61-
41 69, 1990.
42
- 43 GUYTON A. C. **Tratado de Fisiologia Médica**, 9ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, c. 70, p.
44 672, 1997.
45
- 46 HOHMANN, M. S. N.; CARDOSO, R. D. R.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; CRESSWINEIO, J.;
47 CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; DA SILVA, R.V.; PINGE-FILHO, P.; FERREIRA, S. H.;

- 1 CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A. 5-lipoxygenase deficiency reduces
2 acetaminophen-induced hepatotoxicity and 14 lethality. **BioMed Research International**, 2013:
3 627046.
4
- 5 JAMES, L. P.; MAYEUX, P.R., HINSON, J.A. Acetaminophen-induced hepatotoxicity, **Drug**
6 **Metab. Dispos**, v.31, p. 1499-1506, 2003.
7
- 8 JUNIOR E.V.M. Situações que favorecem ou reduzem a hepatotoxicidade pelo acetaminofem.
9 **Revista Suplem. Hepatotoxicidade**, 30(1): 06-47, 2011.
10
- 11 KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J.; JOLY, B.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-
12 LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Development of a pig jejunal explant culture for studying
13 the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. **Toxicology**
14 **in Vitro**, 23(8):1580-1584, 2009.
15
- 16 LARSON, A.M.; POLSON, J.; FONTANA, R.J.; DAVERN, T.J.; LALANI, E.; HYNAN, L.S. *et al.*
17 Acetaminophen induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study.
18 **Hepatology**, 42(6):1364–72, 2005.
19
- 20 MACHADO, L. P.; KOHAYAGAWA, A.; SAITO, M. E.; SILVEIRA, V.F. DA; YONEZAWA, L.
21 A. Erythrocyte oxidative injury and antioxidant mechanisms of interest in Veterinary Medicine.
22 **Revista de Ciências Agroveterinárias**, 8: 84-94, 2009.
23
- 24 MANYIKE, P.T. *et al.* Contribution of CYP2E1 and CYP3A to acetaminophen reactive metabolite
25 formation. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 67(3):275-282, 2000.
26
- 27 MAZER M.; PERRONE J. Acetaminophen-induced nephrotoxicity: Pathophysiology, clinical
28 manifestations, and management. **Journal of Medical Toxicology**, 4: 2-6, 2008.
29
- 30 MAZRAATI, P.; MINAIYAN, M. “Hepatoprotective Effect of Metadoxine on Acetaminophen-
31 Induced Liver Toxicity in Mice”. **Advanced Biomedical Research**, 7(67): 2018.
32
- 33 MCGILL, M. R. *et al.* The Mechanism Underlying Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity in
34 Humans and Mice Involves Mitochondrial Damage and Nuclear DNA Fragmentation. **The Journal**
35 **of Clinical Investigation**, 122(4):1574-1583, 2012.
36
- 37 MCGILL, M. R.; JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in
38 relation to hepatotoxicity and diagnosis. **Pharmaceutical Research**, 30(9): 2174-2187, 2013.
39
- 40 MÜHLBAUER, M. Paracetamol, um AINE particular. **Ciência Atual**, v.7, n.1, p. 02-10, 2016.
41
- 42 NEWSOME, P.N.; HENDERSON, N.C.; NELSON, L.J.; DABOS, C.; FILIPPI, C.; BELLAMY, C.;
43 HOWIE, F.; CLUTTON, R.E.; KING, T.; LEE, A.; HAYES, P.C.; PLEVRIS, J.N. Development of
44 an invasively monitored porcine model of acetaminophen-induced acute liver failure. **BMC**
45 **Gastroenterol**, v.10, p. 34. 2010.
46

1 NIKRAVESH, H. *et al.* “Protective Effect of Gemfibrozil on Hepatotoxicity Induced by
2 Acetaminophen in Mice: The Importance of Oxidative Stress Suppression” **Advanced
3 Pharmaceutical Bulletin**, 8(2):331–339, 2018.

4
5 RANDALL, K. J.; TURTON, J.; FOSTER, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review
6 of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, London, 27(4): 267-284, 2011.

7
8 SPINOSA H. S.; SCHWARZ, A. **Toxicologia aplicada à medicina veterinária**. Barueri, SP:
9 Manole, 2008. 980p.

10
11 STIRNIMANN, G.; KESSEBOHM, K.; LAUTERBURG, B. Liver injury caused by drugs: an update.
12 **Swiss Medical Weekly**, 140, 2010.

13
14 TRUMPER, L.; MONASTEROLO, L.A.; ELIAS, M.M. Nephrotoxicity of acetaminophen in male
15 Wistar rats: role of hepatically derived metabolites. **Journal of Pharmacology and Experimental
16 Therapeutics**, 279: 548–54, 1996.

17
18 VLIEGENTHART, A.D.B.; ANTOINE, D.J., DEAR. J.W., Target biomarker profile for the clinical
19 management of paracetamol overdose Br. **J Clin Pharmacol**, v. 80, p. 351–362, 2015.

20
21 XIMÉNEZ, C.; GONZÁLES, E.; NIEVES, M.; MAGAÑA, U.; MORÁN, P.; GUDIÑO-ZAYAS,
22 M.; PARTIDA, O *et al.* Differential expression of pathogenic genes of *Entamoeba histolytica* vs *E.*
23 *dispar* in a model of infection using human liver tissue explants. **Plos one**, 12(8):1-22, 2017.

24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

7 ARTIGO II

Article to be submitted the *Toxins*

ISSN 2072-6651– Fator de Impacto 3.895

Effects of the Phytic Acid and Injury Induced by Fumonisin (FB₁) in Liver Explants of Piglets and Finishing Pigs: Oxidative Stress, Histological Lesions and Biomarkers

Nadia Cristine Weinert^{1,2}, Ana Paula Frederico R. L. Bracarense^{2*}

¹ Veterinary Medicine Teacher of Guarapuava State Central-West University, Paraná, Brazil;
nadiaweinert@hotmail.com

² Laboratory of Animal Pathology, Londrina State University Londrina, Paraná 86057-970, Brazil;

*Correspondence: ana.bracarense@pq.cnpq.br

Abstract: Mycotoxins are found in many foods and can cause health damage. The development of mechanisms that reduce these toxic effects contributes to individual health. The objective of this study was to establish an *ex vivo* model to characterize liver histological changes by evaluating the effects of fumonisin (FB₁) and phytic acid (IP6) exposure. Hepatic explants from nine swine (120 days old) (EG1) and six piglets 40-days old (EG2) were evaluated in the following treatments: control 0h; control 4 h (Ctrl 4); FB₁ (100 µM); IP6 (5 mM) and FB₁ (100 µM) + IP6 (5 mM). The explants were incubated for 4h and half, two and four hours of biomarkers of lesion, colestase and liver function were evaluated. There was no difference in the injury score for GE1 and GE2. For GE1 and GE2, the IP6 and FB₁ + IP6 treatments were responsible for the significant decrease in the enzymatic activity of FA compared to the control and FB₁. When IP6 was added to FB₁, there was a reduction in ALT and PT activity compared to FB₁ and the control. For GE1 and GE2, exposure to FB₁ induced an increase in GSH compared to IP6 and control, respectively, while incubation with FB₁ + IP6 decreased GSH compared to FB₁. This model was suitable for toxicological evaluation demonstrating the hepatoprotective effect of IP6, can be added to animal feed.

Keywords: fumonisins; hepatotoxicity; mycotoxins; reactive oxygen species

Key Contribution: FB₁ induces in the increase of GSH and NBT in oxidative stress, morphological alteration (nuclear and cytoplasmic vacuolization and megalocytosis) and increase of liver enzymes (ALP, ALT and AST) dosed in the supernatant of the culture medium of the swine liver explants. Phytic acid modulates the enzymatic increases and the oxidative stress induced by FB₁.

1 Introduction

Food and feed are subjected to contamination by highly toxic substances [1, 2]. Mycotoxins are low molecular weight natural products (small molecules) produced as secondary metabolites by filamentous fungi. These metabolites are a toxigenic and chemically heterogeneous group that can cause disease and death in humans and other vertebrates [3].

1 Mycotoxicosis in pigs are responsible for significant losses in production [4]. Fumonisin are
2 produced by the genus *Fusarium* spp. and are hepatotoxic for all species, regardless of the route of
3 administration. The liver disease in animals and humans can progress rapidly to insufficiency, despite
4 the liver's regenerative capacity. Hepatocyte lesions can be detected by measuring the serum enzymes
5 released by hepatocyte rupture, providing information on the extent, magnitude and course (acute or
6 chronic) of this lesion [5]. In addition, increased serum bilirubin and cholesterol may occur [6]. In
7 pigs high-doses of FB₁ induce pulmonary edema and hydrothorax due to reduced left ventricular
8 mechanical efficiency and L-type calcium channel blockage [7]. In acute liver abnormalities,
9 trabecular disorganization, hepatocellular vacuolization, megalocytosis, apoptosis and necrosis have
10 been reported [8].

11 At the cellular level, FB₁ alter sphingosine biosynthesis by inhibiting the enzyme ceramide
12 synthetase. Interruption of sphingolipid production is important as they are essential elements of cell
13 membranes and have a regulatory function of eukaryotic cells [9]. The intracellular action of these
14 mycotoxins has been elucidated, and the induction of oxidative stress and generation of radical
15 oxygen species (ROS) plays an important role in their toxic effects, as observed *in vivo* [10,11] and
16 *in vitro* [12, 13]. However, the association between liver lesions and oxidative stress induced by FB₁
17 has not been elucidated and most studies focusing on the effects of FB₁ on oxidative stress have been
18 performed *in vitro* or using laboratory mammals and chickens [14]. The body has a complex system
19 of antioxidant protection as a defense mechanism against free radicals, which are constantly formed
20 in normal cell metabolism and various pathological events and, when in excess, can cause the
21 oxidation of biological molecules. The imbalance between the oxidative challenge and the antioxidant
22 defense capacity of the organism results in oxidative stress [15].

23 Free radicals, more specifically ROS, are continuously produced within the cell as a result of
24 normal physiological processes and many of them are required for certain biological reactions. An
25 overproduction of these free radicals and/or the deactivation of the cellular defense mechanisms
26 involved in free radical protection will result in an overall rise in their concentrations and eventually
27 give rise to cellular damage [16]. The excess of free radicals in the body is counteracted by
28 antioxidants produced by the body or absorbed in the diet and can be defined as any substance that,
29 when present in a low concentration compared to that of the oxidizable substrate, regenerates the
30 substrate or significantly oxidation [17]. Many factors, including toxins, have the ability to interfere
31 with free radical related processes, thereby inducing oxidative stress in the target cells, which could
32 lead to metabolic and cellular disturbances mainly due to the damage of membrane lipids and
33 proteins, DNA, and carbohydrates [18].

1 Therefore, the search for substances capable of mitigating the toxic effects of mycotoxins is
2 essential and some studies with phytic acid (IP6) like antioxidant have already been carried out [19].
3 IP6 is a natural antioxidant found in cereals, nuts, legumes, oilseeds, spores and pollen. Its antioxidant
4 property results from the ability to bind iron [20]. In the literature, some studies have already
5 demonstrated its protective effects against the action of several mycotoxins in the intestine,
6 demonstrating the reduction of toxic effects by deoxynivalenol and fumonisin B₁ [19, 21], however,
7 there are no data on the possible effects beneficial effects on the liver. Thus, the development of
8 mechanisms that reduce the toxic effects of mycotoxins, such as IP6, can contribute effectively to one
9 health, since exposure to mycotoxins is frequent and significantly affects the health of humans and
10 animals [22].

11 Pigs exhibit physiological characteristics similar to humans leading to an increase use as
12 animal models in laboratory studies. These similarities are observed in several systems, with the
13 gastrointestinal, cardiovascular and pulmonary systems being the most used in laboratory research
14 [23]. Other organs such as the skin, liver and gall bladder of swines are also used in experimental
15 models for humans [24].

16 As an alternative to *in vivo* evaluation, *ex vivo* models such as extracorporeal organ
17 maintenance and explant techniques have shown promising results. The advantages of the technique
18 include the decrease in the number of animals used in the experiment, and the use of animals from
19 abattoirs prevents the euthanasia for experimentation. This is important because, in addition to
20 adapting to ethical and legal aspects, there are many other advantages, including: better environmental
21 control, application of the substance dose directly to the target, and more reliable results, since
22 treatments and control are performed from the same donor. The *ex vivo* model is an attractive
23 technique, but it has some limitations such as tissue incubation time, cell viability and maintenance
24 of the existing *in vivo* [25].

25 Considering the mentioned data, the present study aimed to validate the hepatic explant
26 model and also to evaluate the effect of IP6 on liver explants in pigs exposed to FB₁ using liver
27 biomarkers, histological lesions and oxidative stress response assays. The model used was suitable
28 for evaluating hepatotoxicity, however, further studies are needed to improve the method, aiming to
29 increase the incubation time with the preservation of the tissues morphological structures.

30 **2 Results**

2.1 Enzyme evaluation and liver function

Two different analysis were performed concerning biochemical parameters. We have evaluated differences among the periods of incubation (30 min, 2 and 4 h) and among the treatments.

In the experimental group one (EG1), the factorial analysis of the biochemical data from supernatant of finishing pigs explants culture revealed no interaction effect between factors (treatments x time), but a significant effect of the treatment in the ALP, ALT, and TP levels was observed ($p \leq 0.0001$; $p = 0.04$; $p = 0.02$) (Table 1; Table 3). The treatments IP6 and FB₁+IP6 were responsible for a significant decrease in the ALP levels in relation to control (12.20%, $p \leq 0.0001$; 11.51%, $p \leq 0.0001$) and FB₁ groups (14.90%, $p \leq 0.0001$; 14.24%, $p \leq 0.0001$), respectively. In addition, when IP6 was added to FB₁ a significant reduction in the levels of ALT (35.33%, $p = 0.005$) and TP (8.33%, $p = 0.02$) was observed compared to FB₁ and control groups, respectively.

Table 1 - Effect of treatment independently of the time on the biochemical parameters in the culture supernatant of hepatic explants of finishing pigs (EG1) exposed to the culture medium (Control - CTRL); 5 mM of phytic acid (IP6); 100 μ M of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100 μ M) μ M plus IP6 (5mM) ^a.

	Control	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6
ALP UI/L	38.04±5.19a	33.40±4.13b	39.25±2.92a	33.66±2.57b
GGT UI/L	12.77±5.22a	10.71±4.82a	12.30±2.93a	10.17±3,28a
AST UI/L	963.10±216.05a	909.50±265.95a	923.50±295.10a	897.60±308.57a
ALT UI/L	56.74±29.87ab	60.18±34.24ab	70.23±30.56a	45.42±29.78b
TP g/dL	0.60±0.08a	0.60±0.08ab	0.58±0.07ab	0.55±0.07b
Chol g/dL	4.12±0.33a	4.07±0.26a	4.22±0.40a	4.07±0.27a

^a) Results are expressed as mean±SD. ^{a, b} Different lower case letter indicates statistical significance between treatments independently of the time by factorial ANOVA followed by Tukey's test $P \leq 0.05$. ALP – alkaline phosphatase; GGT - γ -glutamyltransferase; AST - aspartate aminotransferase; ALT - alanine aminotransferase; TP - total protein; Chol - cholesterol; Treat – treatment.

As shown in table 2 and table 4, no significant interaction effect was found between treatment and time for biochemical parameters observed in the tissue culture of piglets (EG2). In contrast, treatment effect was observed in the concentrations of ALP, AST, and ALT ($p \leq 0.0001$; $p = 0.0007$; $p < 0.0001$). In the IP6 and FB₁+IP6 groups a significant decrease in the ALP levels was observed when compared to the control (16.07%, $p = 0.004$; 16.91%, $p = 0.002$) and FB₁ treatments (17.32%, $p = 0.002$; 18.15%, $p = 0.0009$), respectively. In contrast, AST levels were significantly increased

1 in the culture supernatant of the hepatic explants exposed to FB₁ plus IP6 in relation to FB₁ treatment
 2 (1.4 fold increase, p= 0.008). In addition, FB₁ induced a significant increase of ALT levels compared
 3 to control (40.41%, p ≤ 0.0001), IP6 (40.29%, p ≤ 0.0001) and FB₁ plus IP6 (43.73%, p ≤ 0.0001)
 4 treatments.

5 **Table 2** - Effect of treatment independently of the time on the biochemical parameters in the culture
 6 supernatant of hepatic explants of piglets (EG2) exposed to the culture medium (Control - CTRL);
 7 5 mM of phytic acid (IP6); 100 μM of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100μM) μM plus IP6 (5mM) ^{a)}.

	Control	IP6	FB₁	FB₁+IP6
ALP UI/L	41.57±5.34a	34.89±5.95b	41.99±5.08a	34.37±5.37b
GGT UI/L	11.91±1.94a	11.72±1.95a	12.30±3.56a	11.20±1.59a
AST UI/L	596.35±203.77ab	617.32±221.0 ab	518.87±184.8b	714.57±275.04a
ALT UI/L	19.57±6.40b	19.61±6.30b	32.84±9.12a	18.48±9.82b
TP g/dL	0.50±0.04a	0.47±0.07a	0.47±0.05a	0.47±0.06a
Chol g/dL	20.76±5.31a	20.67±5.37a	20.69±5.38a	21.70±3.86a

17 ^{a)} Results are expressed as mean±SD. ^{a, b} Different lower case letter indicates statistical significance between
 18 treatments independently of the time by factorial ANOVA followed by Tukey's test P≤0.05. ALP – alkaline
 19 phosphatase; GGT - γ-glutamyltransferase; AST - aspartate aminotransferase; ALT - alanine aminotransferase;
 20 TP - total protein; Chol - cholesterol; Treat – treatment.

21
 22

1 **Table 3** - Effect of treatment dependently of the time on the biochemical parameters in the culture supernatant of hepatic explants of finishing pigs (EG1)
 2 exposed to the culture medium (Control - CTRL); 5mM of phytic acid (IP6); 100 μ M of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100 μ M) plus IP6 (5mM) ^{a)}.

	30 minutes				2 hours				4 hours				Treatment				P-value		Treat* Time
	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	Treat ²	Time	
ALP	38.00±	34.52±	37.56±	34.11±	36.96±	33.32±	39.17±	33.67±	39.14±	32.36±	41.02±	33.20±	38.04±	33.40±	39.25±	33.66±	<0.0001	0.75	0.32
UI/L	5.99	3.27	2.36	2.88	4.36	2.87	2.76	2.75	4.95	5.68	2.78	2.26	5.19a	4.13b	2.92a	2.57b			
GGT	11.18±	10.50±	10.72±	10.83±	13.82±	10.82±	12.11±	10.39±	13.30±	10.80±	14.08±	9.30±	12.77±	10.71±	12.30±	10.17±	0.06	0.46	0.65
UI/L	3.51	3.84	2.88	2.45	7.03	4.80	1.85	2.91	4.47	5.96	3.14	2.60	5.22a	4.82a	2.93a	3.28a			
AST	931.71±	894.89±	926.20±	774.94±	1084.29±	1031.9±	938.28±	1098.3±	873.31±	801.61± ³	903.28±	819.5±	963.10±	909.50±	923.50±	897.60±	0.68	0.001	0.58
UI/L	206.48	235.52	260.20	255.11	161.93	210.09	190.29	189.22	230.40	07.51	329.88	373.40	216.05a	265.95a	295.10a	308.57a			
ALT	36.25±	37.20±	42.67±	26.94±	57.21±	60.00±	72.00±	54.72±	76.76±	83.34±	92.69±	76.85±	56.74±	60.18±	70.23±	45.42±	0.04	<0.0001	0.95
UI/L	16.62	17.32	13.24	9.97	22.56	31.60	23.01	21.49	3.83	35.39	33.79	30.25	29.87ab	34.24ab	30.56a	29.78b			
TP	0.54±	0.58±	0.52±	0.49±	0.63±	0.58±	0.58±	0.57±	0.65±	0.64±	0.63±	0.61±	0.60±	0.60±	0.58±	0.55±	0.02	<0.0001	0.26
g/dL	0.06	0.09	0.07	0.06	0.06	0.09	0.04	0.05	0.08	0.06	0.05	0.06	0.08a	0.08 ab	0.07ab	0.07b			
Chol	4.07±	4.07±	4.33±	4.00±	4.21±	4.07±	4.17±	4.11±	4.07±	4.07±	4.17±	4.11±	4.12±	4.07±	4.22±	4.07±	0.24	0.87	0.70
g/dL	0.27	0.27	0.50	0.00	0.43	0.27	0.35	0.33	0.27	0.27	0.35	0.33	0.33a	0.26a	0.40a	0.27a			

3
4
5

6 **Table 4** - Effect of treatment dependently of the time on the biochemical parameters in the culture supernatant of hepatic explants of piglets (EG2) exposed to
 7 the culture medium (Control - CTRL); 5 mM of phytic acid (IP6); 100 μ M of fumonisin B₁ (FB₁) and FB₁ (100 μ M) μ M plus IP6 (5mM) ^{a)}.

	30 minutes				2 hours				4 hours				Treatment				P-value		Treat* Time
	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	CTRL	IP6	FB ₁	FB ₁ +IP6	Treat ²	Time	
ALP	41.65±	36.40±	41.72±	36.12±	41.88±	34.55±	43.08±	35.28±	41.18±	33.73±	41.17±	31.73±	41.57±	34.89±	41.99±	34.37±	<0.0001	0.41	0.97
UI/L	5.92	4.41	5.48	5.77	5.82	5.30	5.77	5.36	5.28	8.27	4.71	4.82	5.34 a	5.95 b	5.08 a	5.37 b			
GGT	10.57±	10.60±	9.57±	10.05±	11.60±	11.83±	12.77±	11.45±	13.55±	12.75±	14.53±	12.12±	11.91±	11.72±	12.30±	11.20±	0.47	<0.0001	0.60
UI/L	0.96	1.43	1.34	0.85	1.39	1.43	4.56	1.50	2.11	2.48	2.26	1.70	1.94 a	1.95 a	3.56 a	1.59 a			
AST	352.23±	385.28±	355.1±	433.9±	647.0±	644.1±	528.0±	785.2±	789.7±	822.1±	673.4±	936.3±	596.35±	617.32±	518.87±	714.57±	0.0007	<0.0001	0.69
UI/L	57.18	68.90	102.71	112.69	75.65	122.48	73.88	217.67	112.70	174.26	197.89	181.53	203.77ab	221.0 ab	184.8 b	275.04 a			
ALT	13.67±	14.33±	32.35±	10.98±	20.05±	20.00±	29.20±	24.35±	25.00±	24.50±	36.68±	23.35±	19.57±	19.61±	32.84±	18.48±	<0.0001	0.0006	0.36
UI/L	3.19	4.24	6.16	5.30	4.72	4.12	9.04	9.85	5.41	6.14	10.13	6.15	6.40 b	6.30 b	9.12 a	9.82 b			
TP	0.47±	0.42±	0.48±	0.43±	0.52±	0.50±	0.48±	0.47±	0.50±	0.52±	0.47±	0.48±	0.50±	0.47±	0.47±	0.47±	0.45	0.03	0.41
g/dL	0.05	0.07	0.04	0.08	0.04	0.06	0.07	0.05	0.06	0.04	0.05	0.07	0.04a	0.07a	0.05 a	0.06 a			
Chol	20.78±	20.67±	20.67±	20.67±	20.67±	20.67±	20.72±	21.45±	20.83±	20.67±	20.67±	23.00±	20.76±	20.67±	20.69±	21.70±	0.92	0.92	0.99
g/dL	5.43	5.71	5.71	5.71	5.71	5.71	5.74	3.79	5.81	5.71	5.71	0.00	5.31a	5.37a	5.38 a	3.86 a			

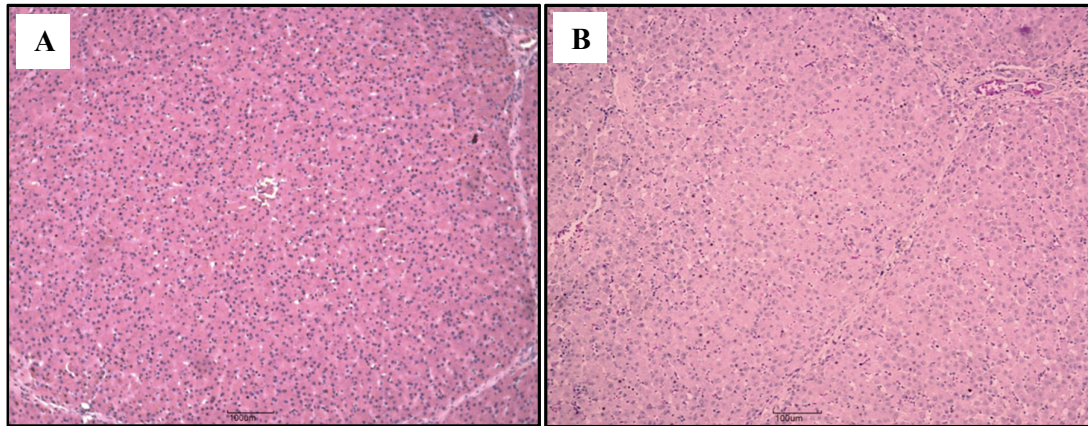
8 ^{a)} Results are expressed as mean±SD. ^{a, b} Different lower case letter indicates statistical significance between treatments independently of the time by factorial ANOVA followed
 9 by Tukey's test P≤0.05. ALP – alkaline phosphatase; GGT - γ -glutamyltransferase; AST - aspartate aminotransferase; ALT - alanine aminotransferase; TP - total protein; Chol
 10 - cholesterol; Treat – treatment.

1 2.2 Morphological Assessment

2

3 No significant difference was observed in the lesion score among the treatments for
4 both EG1 and EG2. The mean values of histological score (EG1) were 0.9 ± 0.7 for control;
5 1.25 ± 1.5 for FB₁; 1.4 ± 1.3 for IP6 and 1.65 ± 1.9 for FB₁ + IP6 and for EG2 were 1.4 ± 0.73
6 for control; 2.0 ± 1.9 for FB₁; 1.6 ± 0.8 for IP6 and 1.4 ± 0.9 for FB₁ + IP6. For de EG1, the
7 histological aspects in the control explants indicated a well-organized hepatocyte trabeculae,
8 with mild hepatocyte cytoplasmic vacuolization. The main histological findings in explants
9 submitted to FB₁ treatments were nuclear vacuolization and hepatocyte megalocytosis, whereas
10 IP6 and FB₁+IP6 treatments remained similar to the control. For EG2 the histological aspects
11 for the treatments were similar to EG1 (Figure 1).

12



13

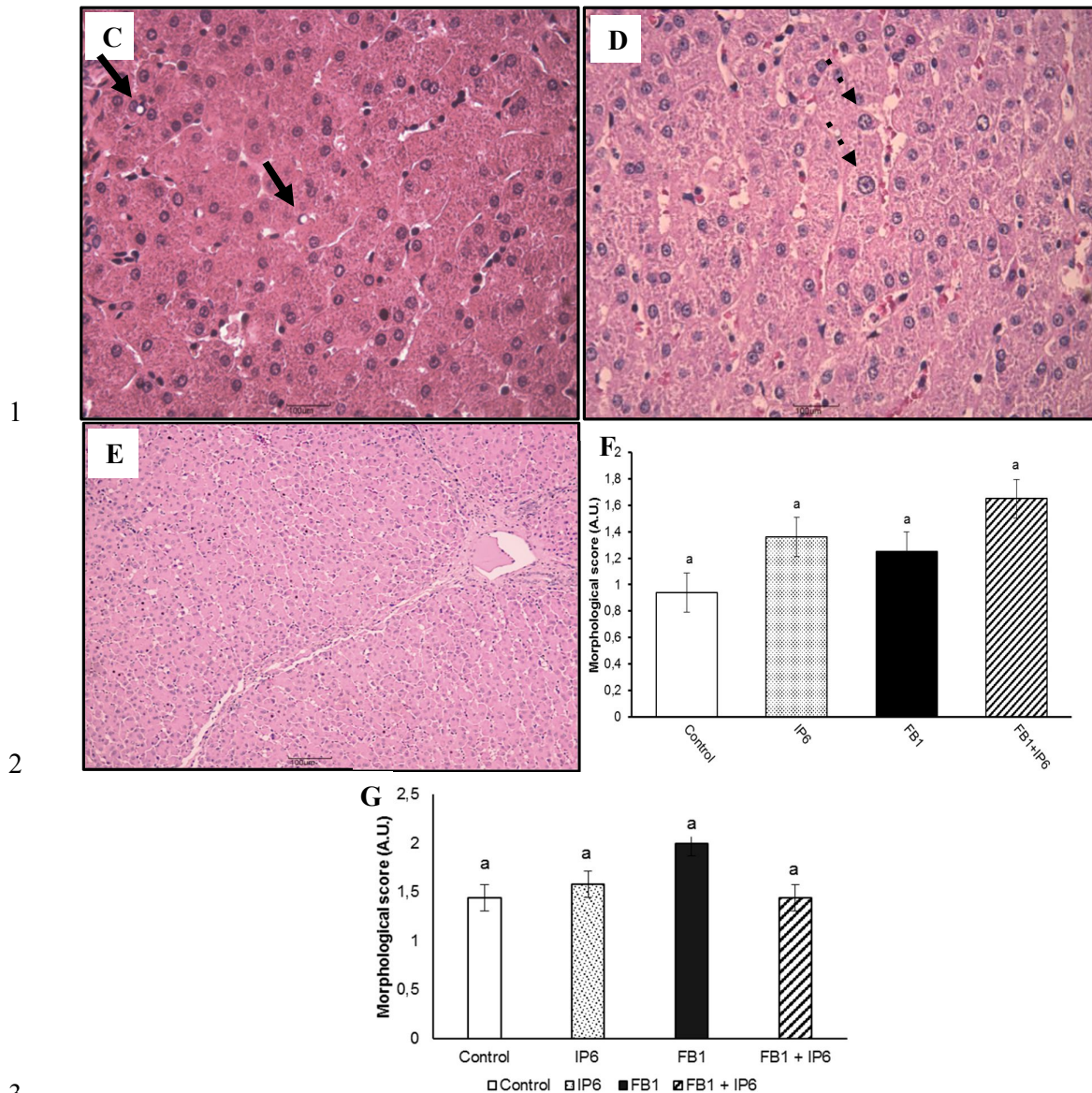


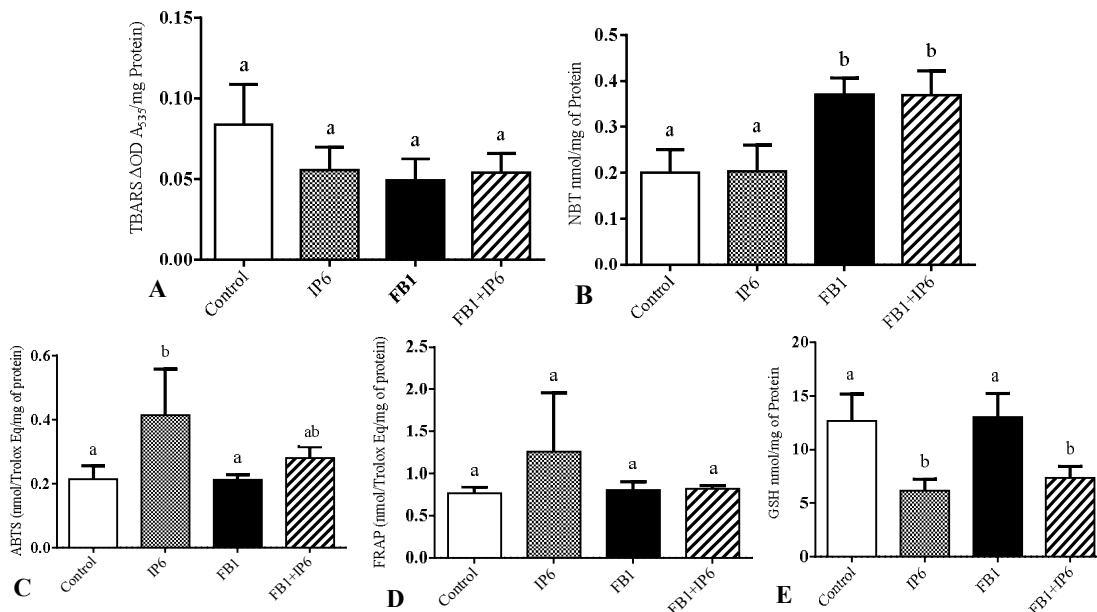
Figure 1 - Histological aspects of pigs' liver explants. A. Control group. Normal aspect of liver. HE. Bar 100 μm . B. Phytic acid (IP6) group. Normal aspect of liver. C and D. Fumonisin B₁ group. Nuclear vacuolization of hepatocytes (thin arrow) (C) and hepatocyte megalocytosis (dotted arrow) (D). HE. Bar 100 μm . E. FB₁ + IP6. Normal aspect of liver. HE. Bar 100 μm . F. Liver lesion score in finishing pigs (EG1). Morphological score (AU—Arbitrary Units). G. Liver lesion score in piglets (EG2) Morphological score (AU—Arbitrary Units).

^a Means followed by the same letters do not difference significantly by ANOVA test ($p \leq 0,05$).

2.3 Oxidative Stress Evaluation

2.3.1 Experimental group 1 (EG1): finishing pigs

1 A significant increase in NBT levels was observed in the FB₁ and FB₁+IP6 groups when
 2 compared to the other treatments. On the other hand, no difference among treatments occurred
 3 in TBARS levels (Figure 2). Concerning the antioxidant capacity, significant differences were
 4 observed in GSH and ABTS levels. Exposure to FB₁ induced a significant increase (112%) in
 5 endogenous GSH levels compared to the IP6 group, whereas the incubation with FB₁+IP6
 6 produced a decrease in GSH levels (76.3%) compared to the FB₁ group (Figure 2). Increased
 7 levels of ABTS (95.2%) were observed in the IP6 group compared to the control and FB₁ groups
 8 (Figure 2).



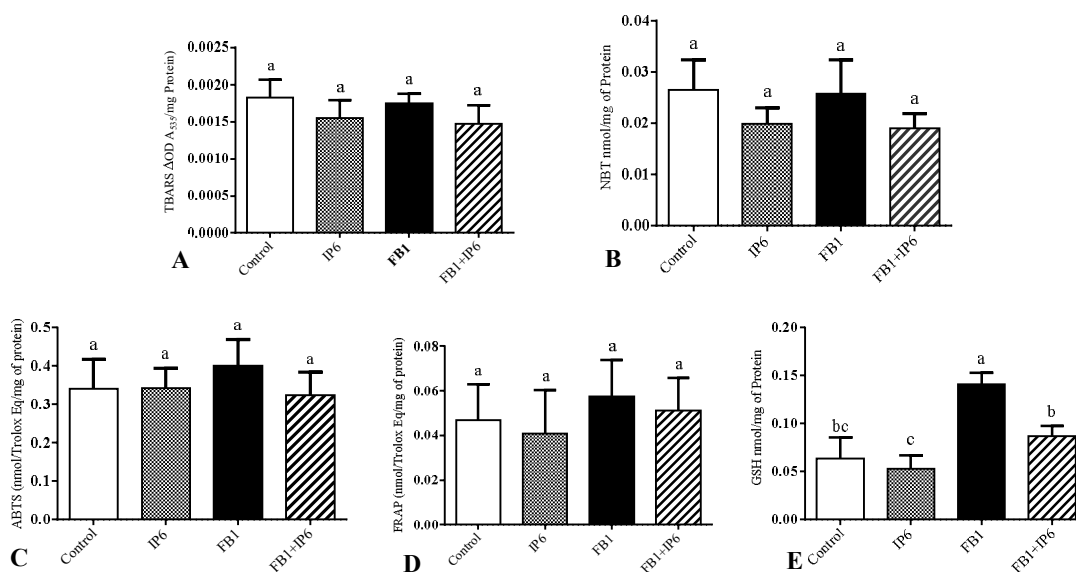
9
 10
 11 **Figure 2** - Effects of fumonisin (FB₁) and phytic acid (IP6) on liver oxidative stress in EG1.
 12 Explants exposed to control treatment (□); IP6 (5mM) (▤); FB₁ (100µM) (■) and FB₁
 13 (100 µM) plus IP6 (5 mM) (▨). Lipid peroxidation and superoxide anion production. A.
 14 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). B. Nitroblue tetrazolium (NBT). Liver
 15 antioxidant defense. C. Free-radical scavenging ability (ABTS). D. Ferric reducing ability
 16 potential (FRAP). E. Reduced glutathione (GSH).

17 ^{ab} Means followed by different letters indicate statistical significance by ANOVA test ($p \leq 0,05$).

20 2.3.2 Experimental group 2 (EG2): Piglets

21
 22 Following exposure to FB₁ (100µL) for 4 h intracellular reactive species (iROS) were
 23 measured. Overall, these results indicate that FB₁ caused increased ROS that were counteracted
 24 by engaging the antioxidant defense. The liver explants exposed to FB₁ showed a significant
 25 increase in endogenous GSH levels compared to the control (133.3%). The presence of IP6 with
 26 FB₁ induced a decrease in GSH levels 35.7% compared to the FB₁ group (Figure 3). Data

1 indicate that pre-treatment with IP6 did not differ statistically for FRAP, ABTS, NBT and
 2 TBARS in cellular antioxidant capacity and oxidative response in liver explants.



3
 4 **Figure 3** - Effects of fumonisin FB₁ (FB₁) and phytic acid (IP6) on liver oxidative stress in the
 5 EG2. Explants exposed to control treatment (□); IP6 (5mM) (▨); FB1 (100μM) (■) and
 6 FB1 (100 μM) + IP6 (5 mM) (▩). Lipid peroxidation and superoxide anion production. A.
 7 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). B. Nitroblue tetrazolium (NBT). Liver
 8 antioxidant defense. C. Free-radical scavenging ability (ABTS). D. Ferric reducing ability
 9 potential (FRAP). E. Reduced glutathione (GSH).

10 ^{ab} Means followed by different letters indicate statistical significance by ANOVA test ($p \leq 0,05$).

12 3 Discussion

13 Pigs are considered an adequate experimental model due to the anatomical and
 14 physiological similarity with the human species and other mammals [23]. The efficacy of the
 15 explant model has already been demonstrated in other organs [19, 26]; however, there is no data
 16 on the efficacy of the technique in liver fragments.

17 During the 4-hour period, the liver tissue was preserved, allowing the analysis. Prior
 18 to this study, the morphology of this tissue was compared between 0 hours (no incubation) and
 19 4 hours of incubation in the control group and no significant difference between the groups
 20 were observed (data not shown). Considering tissue maintenance during incubation, explants
 21 were exposed to different treatments, including a well-known hepatotoxic mycotoxin.
 22 Histological analysis showed mild changes in explants submitted to FB₁, meanwhile, the mean
 23 lesion score remained similar in all treatments. With these data, it is possible to infer that the
 24 morphological and biochemical aspects indicate that the *ex vivo* model was suitable for

1 experimentation. The absence of significant differences between these groups may be due to
2 the short incubation time or the mode of exposure (direct contact), as liver histological changes
3 have already been demonstrated as a consequence of fumonisin administration [27].

4 Fumonisin cause hepatic injury in all species regardless the route of administration.
5 In pigs, morphologic alterations were observed following ingestion (≥ 23 ppm) or intravenous
6 administration [28]. Acute hepatic changes include disorganization of hepatic cords,
7 hepatocellular vacuolation, megalocytosis, apoptosis, necrosis, and cell proliferation [1]. In this
8 study, after 4h of exposure to FB₁ the explants exhibited mainly hepatocyte nuclear and
9 cytoplasm vacuolization, megalocytosis, inflammatory infiltrate and apoptosis, agreeing with
10 the effects of fumonisin B₁ in murine liver included apoptotic hepatocytes and occasional
11 mitotic figures scattered throughout the liver tissue with inflammatory changes characterized
12 by anisocytosis and cytoplasmic vacuolation [29].

13 Another aim of this study was to assess biochemical parameters of liver lesion and
14 function in this model. First, we aimed to analyze liver injury and cholestasis indicators, and
15 second the liver function. Interestingly, the values for the liver enzymes GGT and ALT obtained
16 in the supernatant were similar to serum values for pigs (GGT: 10-60 UI/L and ALT: 31-58
17 UI/L). For the other parameters (ALP, AST, total protein and cholesterol) the values diverged
18 [30]. In regard to the period of incubation, the exposure of liver explants to FB₁ induced a
19 significant increase in three different parameters (ALP, AST and ALT enzymes) over the time,
20 indicating a hepatotoxic effect. Changes in serum total bilirubin, ALP, AST, GGT, and
21 cholesterol have been associated with fumonisins chronic intoxication in pigs *in vivo* models
22 [31].

23 For the EG1 (finishing pigs), there was a reduction in the enzymatic activity of ALT
24 in the FB1 plus IP6 group compared to the control and FB1 group. For EG2 (piglets), there was
25 a reduction in activity in the control groups, IP6 and FB1 plus IP6, compared with FB1 group.
26 This enzyme, as well as ALT, when measured in swine have little diagnostic value, due to the
27 low tissue concentration in this species, but due to its increase, it is suggested a more intense
28 lesion without histological detection or secondary elevation of synthesis following an intense
29 stimulus [32, 33]. Previous studies suggested that hepatic transaminases increase 12-72 hours
30 after injury, and the time factor (4h) may be one of the causes of enzyme elevation [34, 35].

31 In addition to these data, a significant reduction was observed in IP6 and FB1 + IP6
32 group compared to FB₁ in ALP enzymes for both experimental groups (EG1 and EG2). This

1 result suggests a protective effect of IP6 in the liver, since these enzymes are related to liver
2 lesion. A beneficial effect of IP6 was previously reported in intestinal explants exposed to FB₁
3 [19], however, to the best of author's knowledge there is no data regarding the use of fumonisins
4 and phytic acid in liver explants. Since IP6 is an antioxidant, it may be the mechanism of this
5 substance against mycotoxins, however, the mechanism of IP6 against mycotoxins is not yet
6 understood [21].

7 That in all domestic species AST activity is high in the liver, so in acute or chronic liver
8 injury the plasma concentration of AST will be high [36]. The increase in the enzymatic activity
9 of AST (EG1) occurred in the FB₁ plus IP6 group compared to the FB₁ group. The incubation
10 of tissues with high metabolism for periods of more than four hours induces loss of tissue
11 viability due to prolonged hypoxia [37]. Increase in hepatic transaminases 12-72 hours after
12 injury, and the time factor may be one of the causes of enzyme elevation [34, 30].

13 The morphological and biochemical results indicate that the *ex vivo* model was suitable
14 for experimentation. Previous work has shown that fumonisin B₁ increases the susceptibility to
15 lipid peroxidation due to oxidative stress [38]. Analysis for oxidative stress involves radical
16 generation (resulting in lipid peroxidation) and depletion of antioxidant compounds. For the
17 finishing pigs, a significant increase in NBT levels was observed in FB₁ and FB₁+IP6 groups
18 compared to control and IP6. NBT is associated with free radical generation [39] indicating the
19 potential of fumonisins to induce oxidative stress. Similarly, human hepatoma cells exposed to
20 FB₁ exhibited increased levels of reactive oxygen species [42]. The exposure to mycotoxins
21 probably induced an increase in cytoplasmic and mitochondrial permeability, which may be
22 associated with ROS generation and resulting lipid peroxidation, as observed *in vitro* [12] and
23 *in vivo* [6,9]. On the other hand, the addition of IP6 induced no protective effect in NBT levels
24 compared to FB₁. The antioxidant response capacity was evaluated through ABTS, FRAP and
25 GSH levels. An increase in ABTS levels was observed in IP6 group compared to other
26 treatments. Likely, GSH levels increased in FB₁ compared to IP6 and FB₁+IP6.

27 For the piglets, FB₁ demonstrated effects only for GSH. The exposure to mycotoxins
28 probably induced an increase in cytoplasmic and mitochondrial permeability, which may be
29 associated with ROS generation and resulting lipid peroxidation, as observed *in vitro* [41, 16]
30 and *in vivo* [12, 13], but there was no difference ($p \geq 0.05$) in the lipid peroxidation (TBARS)
31 test, comparing the control and treated with FB₁ group. The GSH level increased after FB₁
32 exposure.

1 Controversial results were reported in the literature. Recently, increased levels of GSH,
2 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were reported
3 in hepatoma cells treated with FB₁ [39]. Mice and rats fed fumonisin-diets also presented
4 increased levels of GSH in liver and kidney [10,42]. However, reductions in these same
5 enzymes were seen in other studies [9,11]. The elevation of GSH can be justified by the high
6 hepatic antioxidant capacity and the liver being considered an organ with great regeneration
7 capacity. Glutathione (GSH) together with two enzymes, glutathione peroxidase (GPx or GSH-
8 Px) and glutathione reductase (GR or GSH-Rd), and the presence of selenium in the enzyme
9 (selenocysteine) an antioxidant in the body. This system also catalyzes the dismutation of
10 hydrogen peroxide in water and oxygen, with glutathione operating in cycles between its
11 oxidized form and its reduced form [15].

12 The mechanisms of action of oxidative stress induced by FB₁ include mitochondrial
13 injury, activation of caspase-3 [40]. The oxidative stress induced by FB₁ occurs indirectly via
14 the intracellular accumulation of sphingolipids [41], a toxic mechanism with slower progression
15 at the ribosomal level. IP6 promoted a significant decreased in GSH level and antioxidant
16 capacity in the liver explants compared exposed to FB₁, IP6's antioxidant capacity may have
17 occurred. In agreement, the ability of IP6 to protect cells against oxidative stress has been
18 associated with the inhibition of ROS generation, increase of GSH level, CAT, GPx, and SOD
19 content, and decrease of lipid peroxidation (MDA) in hepatocarcinogenesis studies in rats [42,
20 43, 44]. The beneficial effects of IP6 against FB₁ toxicity are probably associated with its
21 antioxidant capacity, mainly its ability to inhibit the Fenton reaction and formation of hydroxyl
22 radicals [19].

23 The development of mechanisms that reduce the toxic effects of mycotoxins such as IP6
24 effectively contributes to one health, as exposure to mycotoxins is frequent and significantly
25 affects the health of humans and animals [41]. Moreover, the data from this work can be
26 extrapolated to human medicine, since swine liver metabolism is similar to that of human
27 organs [23]. The present results demonstrate that the protective effect of IP6 on the liver
28 oxidative stress is associated with its capacity to mitigate lipid peroxidation and increase the
29 antioxidant capacity of the tissue.

30 **4 Conclusions**

1 The results of the present study indicate that liver explants are appropriate for
2 assessing the effects of toxic substances on cell integrity. From the biomarkers evaluated in this
3 model it was found that FB₁ caused injury early and effectively. In conclusion, the hepatic *ex*
4 *vivo* model provides an opportunity to evaluate both tissue morphology and biochemical
5 aspects. However, more studies are needed to elucidate the mechanisms and intracellular
6 signaling pathways that trigger oxidative stress induced by this mycotoxin in the liver. Phytic
7 acid exerts beneficial effects upon the liver, modulating the changes induced by FB₁ and
8 protecting cells against oxidative stress. In this way, the use of explants seems to be the
9 promising model for toxicological studies, besides contributing with the 3 R's of the animal
10 experimentation.

11 **5 Material and Methods**

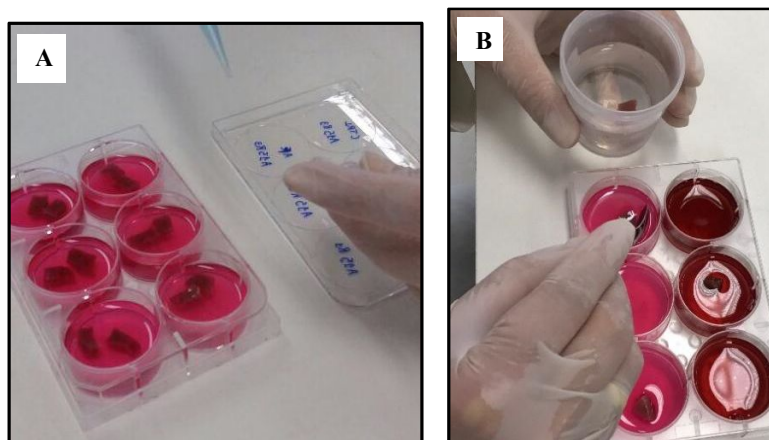
12 *5.1 Animals and Reagents (FB₁ and Phytic Acid)*

13
14 Six 40-day-old (half-castrated males and half females) swinelets (nearly 13.0 Kg) and 9
15 pigs 120-day-old (half-castrated males and half females) pigs from slaughterhouses were used
16 in the present study. The FB₁ (MW: 721.83; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI,
17 USA) were dissolved in ultrapure water at final concentrations of 100 µM for FB₁, and stored
18 at 4°C. The phytic acid salt (MW: 819; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in
19 distilled water to the concentration of 15 mM, and the pH adjusted to 7.2. The solution was
20 stored at –20°C before dilution in the explant culture media. The IP6 (5 mM) and FB₁ (100 µM)
21 concentrations used were chosen according to previous studies [19, 45].

22 *5.2 Ex Vivo Experimental Model*

23
24 The experimental procedures on animals were approved by the ethics commission,
25 (OF. CIRC. CEUA N° 15/2019 - 13812.2017.19). The piglets were euthanized (acepromazine
26 1%, sodium pentobarbital 40 mg/Kg and KCl 15%) and fragments of the liver were sampled,
27 washed with a buffer solution. The explants submitted into the following treatments: control
28 (Ctrl 4), fumonisin B₁ (100 µM), phytic acid (5 mM) and fumonisin B₁ (100 µM) + phytic acid
29 (5 mM). For each treatment, six explants were sampled using a microtome razor (8 mm),
30 resulting in 24 explants/ animal totaling 216 explants for the EG1 and 144 explants for the EG2.
31 The explants were incubated in six well plates (two explants/well) containing 1mL of the agar

1 (1,5%) and filled with 5mL of DMEM (Gibco-BRL Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)
2 supplemented with penicillin/streptomycin (1.25 μ L/mL, Gibco-BRL Life Technologies,
3 Carlsbad, CA, USA), fetal bovine serum (100 μ L/mL, Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and
4 glutamine (0.4 μ L/mL, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Then, the explants were incubated
5 for 4 hours in an incubator at 37 °C in a chamber under controlled conditions with orbital
6 shaking. Supernatant (200 μ L) was sampled from each well at half, two and four hours for
7 biochemical analysis (Figure 4). After a total period of incubation, the explants (three from each
8 treatment) were fixed in 10% neutral buffered formalin solution, dehydrated in alcohols and
9 embedded in paraffin for histological. Two explants were immediately frozen in liquid nitrogen
10 and posteriorly stored at -80°C for the quantification of reduced glutathione (GSH),
11 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), nitroblue tetrazolium (NBT), 2,2'-azino-bis-
12 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) and ferric-reducing antioxidant power
13 (FRAP) assays.



15 **Figure 4** - A. Supernatant harvest for biochemical measurements. B. Collection of liver
16 explants after 4-hours for histopathological processing, in order to verify the different injury
17 scores.
18

19 5.3. *Histological evaluation*

20

21 Following fixation, the explants were dehydrated in increasing alcohol solutions and
22 embedded in paraffin wax. Tissue sections (5 μ m) were stained with hematoxylin–eosin for
23 histopathological evaluation. The histological sections were analyzed under a lesion score. The
24 criteria evaluated were trabecular disorganization, cytoplasmic and nuclear vacuolar
25 degeneration, inflammatory infiltrate, cellular megalocytosis, apoptosis and necrosis, and these

1 were scored according to the severity of the lesion, in zero (0) for unchanged tissues, one (1)
2 for mild or (2) for moderate changes and three (3) for severe alterations. The criteria of
3 cytoplasmic and nuclear vacuolar degeneration, since they present an important factor in the
4 development of the lesion, when present had the score multiplied by two and the criterion of
5 necrosis because it is the most advanced stage of the lesion, multiplied by three. After the
6 evaluation of the established criteria, the sum of all the scores was done in order to obtain the
7 lesion score, allowing a comparison between the experimental groups.

8 *5.3 Biomarkers assessment of lesion and liver function*

9

10 Biochemical evaluation of the supernatant was carried out at half, two and four hours
11 of incubation. The aim was to measure the levels of enzymes indicating injury, cholestasis and
12 liver function. The dosage of alkaline phosphatase (ALP) and γ -glutamyltransferase (GGT)
13 (induction enzymes); alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST)
14 (extravasation enzymes) were measured by enzyme activity test of high sensitivity and for
15 evaluation of function, cholesterol and total protein by means of a colorimetric assay. These
16 tests were processed by the Dimension Clinical Chemistry System (Siemens, Germany)
17 according to the manufacturer standardized technique.

18

19 *5.4 Oxidative stress response analysis*

20

21 Liver samples were also collected to determine lipid peroxidation and superoxide anion
22 production through the levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) and nitroblue
23 tetrazolium (NBT) reduction assays, respectively. In addition, the antioxidant capacity was
24 evaluated through the reduced glutathione (GSH), ferric reducing ability potential (FRAP) and
25 free-radical scavenging ability (ABTS). The oxidative stress response was measured in the
26 different treatments after four hours of incubation.

27

28 *5.5.1 Determination of antioxidant capacity by the reduced glutathione (GSH), ferric-reducing* 29 *ability potential (FRAP) and free-radical scavenging ability (ABTS) assay*

30

31 The collected liver samples were frozen at -80 °C. These samples were processed and
32 homogenized with 500 μ l of 1.15% KCl, then centrifuged (200 x g, 10min, 4°C) and with the

1 resulting supernatant the total antioxidant capacity of the liver was assessed by FRAP and
2 ABTS assays [46].

3 *5.5.1.1 GSH Levels Measurement*

4

5 Glutathione (GSH) is a thiol tripeptide, which has several biological functions, such as
6 acting as an antioxidant [47]. The intracellular concentration of GSH is an indicator of oxidative
7 stress. Levels of glutathione (GSH) in tissue samples were determined using a
8 spectrophotometric method previously described [48]. Frozen liver samples were homogenized
9 using Tearor Tissor (Biospec, São Paulo, SP, Brazil) in cold 0.02M EDTA buffer. The
10 homogenate was treated with 50% trichloroacetic acid and centrifuged (1500 x g, 15 min), and
11 to the supernatant 0.4 M Tris-HCl (pH 8.9) and 10 mM dithiobisnitrobenzoic acid were added.
12 After 5 min, the absorbances were read at 412 nm (Multiskan GO Microplate
13 spectrophotometer, ThermoScientific, Vantaa, Finland). A standard curve was prepared using
14 different concentrations of GSH, in addition to the other reagents mentioned above. The results
15 were presented as nmol GSH / mg protein.

16 *5.5.1.2. FRAP and ABTS Assays*

17

18 The ability to reduce the radical cation 2,2'-azinobis- (3-ethylbenzothiazoline-6-
19 sulfonate; ABTS⁺) (ABTS assay) and iron-reducing antioxidant power (FRAP) was evaluated
20 in liver explants for different treatments. The FRAP method is based on the production of Fe²⁺
21 ion (ferrous form) from the reduction of the Fe³⁺ ion (ferric form) present in the tripyridyltriazine
22 complex (TPTZ) by means of acidic antioxidants. This assay provides a very useful "total"
23 antioxidant concentration [17]. For the FRAP assay, 15 µl of the supernatant was mixed with
24 45 µl of deionized water and 200 µl of freshly prepared FRAP reagent (Sigma Chemical Co.,
25 St. Louis, MO, USA). The mixture was then incubated at 37° C for 30 min and the absorbance
26 was measured at 595 nm (GO Multiskan microplate spectrophotometer, ThermoScientific,
27 Vantaa, Finland). The ABTS procedure is based on the ability of antioxidant molecules to
28 reduce ABTS cation radical [49]. For the ABTS assay, the ABTS solution (Sigma Chemical
29 Co., St. Louis, MO, USA) was diluted with phosphate buffered saline at pH 7.4 for an
30 absorbance of 0.80 at 730 nm. Then, 200 µl of diluted ABTS solution was mixed with 15 µl of
31 supernatant. After 6 minutes the absorbance was measured at 730 nm (Multiskan GO, Thermo

1 Scientific). A standard curve was prepared using different concentrations of Trolox (1.5-30
2 $\mu\text{mol} / \text{l}$, final concentrations). The protein levels in the samples were used for normalization of
3 the data and the results were expressed as nmol of the Trolox equivalent (Sigma Chemical Co.,
4 St. Louis, MO, USA) per milligrams of protein in both assays.

5 *5.5.2. Determination of the oxidative response by nitroblue tetrazolium (NBT) and* 6 *thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) assays*

8 *5.5.2.1 Nitroblue tetrazolium (NBT)*

9
10 The superoxide anion production was determined by the reduction of the redox dye
11 nitroblue tetrazolium (NBT) [50]. The tissues were homogenized with 500 μl of 1.15% KCl
12 and aliquots of 50 μl of homogenate were transferred to a 96-well plate, followed by the addition
13 of 100 μl of NBT solution (1 mg/mL), and maintained at 37°C in a warm bath for 1 h. The
14 supernatant was carefully removed, and the formazan precipitated was then solubilized by
15 adding 120 μl of 2M KOH and 140 μl of DMSO. The optical density was measured by
16 microplate spectrophotometer (Multiskan GO, Thermo Scientific) at 600 nm. The protein levels
17 in the samples were used for data normalization and the results were presented as NBT
18 reduction (optical density [OD] per milligram of protein).

19 *5.5.2.2. Lipid Peroxidation Measurement (TBARS)*

20
21 Lipid peroxidation in the liver explants was assessed by determining TBARS levels,
22 using an adapted method [49]. For this assay, trichloroacetic acid (10%) was added to the
23 homogenate to precipitate proteins, followed by centrifugation ($1000 \times g$, 3 min, 4° C). The
24 protein-free supernatant was separated and mixed with thiobarbituric acid (0.67%). The mixture
25 was incubated for 15 min in water bath (100°C) and transferred to an ice bath. This procedure
26 measures the malondialdehyde (MDA) an intermediate product of lipid peroxidation,
27 determined by the difference between absorbance at 535 and 572 nm using a microplate
28 spectrophotometer reader. The result was presented as TBARS (OD A535-A572/mg of
29 protein).

1 5.6. Statistical Analysis

2

3 The data (mean \pm standard error) were analyzed using the free software Sisvar 5.6 [51].
4 The histological score was compared by one-way analysis of variance (ANOVA), followed by
5 Tukey's test for multiple comparisons and liver biomarkers were analyzed using factorial
6 ANOVA, followed by the Tukey test (p values ≤ 0.05). The effect of treatments on the oxidative
7 stress response (GSH, TBARS, ABTS, and FRAP assays) was analyzed by ANOVA, followed
8 by Tukey's test (p values ≤ 0.05), using the statistical software GraphPad Prism 6.01 (GraphPad
9 Software Inc., La Jolla, CA, 38 USA).

10 **Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

11 References

- 12 1. Sabino, M. Mycotoxins in food. In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. São Paulo:
13 Atheneu Editora, **1996**, 461-71.
- 14 2. Brera, C.; Miraglia, M.; Colatosti, M. Evaluation of the Impact of Mycotoxins on Human
15 Health: Sources of Errors. *Microchemical Journal*. **1998**, 59, p. 45–49.
- 16
17 3. Zain, Mohamed E. “Impact of Mycotoxins on Humans and Animals.” *Journal of Saudi*
18 *Chemical Society* **2011**, 15, 2: 129–44. <https://doi.org/10.1016/j.jsocs.2010.06.006>.
- 19 4. Castro, I. C. Di; Oliveira, H. F. De; Mello, H. H. C.; Mascarenhas, A. G. Micotoxinas na
20 produção de suínos Mycotoxins in swine production. *Revista Portuguesa de Ciências*
21 *Veterinárias*. **2015**, 110, 6–13.
- 22
23 5. Kolf-Clauw, M.; Castellote, J.; Joly, B.; Bourges-Abella, N.; Raymond-Letron, I.; Pinton, P.;
24 Oswald, I. P. Development of a swine jejunal explant culture for studying the gastrointestinal
25 toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. *Toxicology in Vitro*
26 2009, v. 23, n. 8, p. 1580-1584.
- 27
28 6. Haschek, W. M.; Motelin, G.; Ness, D. K.; Harlin, K. S.; Hall, W. F.; Vesonder, R. F.;
29 Peterson, R. E.; Beasley, V. R. Characterization of fumonisin toxicity in orally and
30 intravenously dosed swine. *Mycopathologia*. **1992**, 117, 83–96.
- 31
32 7. Stockmann-Juvala, H.; Savolainen, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action
33 of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*. **2008**, 27, 799–809.
- 34
35 8. Haschek, W. M.; Gumprecht, L. A.; Smith, G.; Tumbleson, M. E.; Constable, P. D.
36 Fumonisin toxicosis in swine: An overview of porcine pulmonary edema and current
37 perspectives. *Environmental Health Perspectives*. **2001**, 109, 251–257.
- 38

- 1 9. Hentz, S. S.; Showker, J. L.; Meredith, F. I.; Riley, R. T. Inhibition of sphingolipid
2 biosynthesis decreases phosphorylated ERK2 in LLC-PK1 cells. *Food and Chemical*
3 *Toxicology*. **2005**, 43, 123–131.
- 4 10. Osselaere, A.; Santos, R.; Hautekiet, V.; Backer, P.D.; Chiers, K.; Ducatelle, R.; Croubels,
5 S. Deoxynivalenol impairs hepatic and intestinal gene expression of selected oxidative stress,
6 tight junction and inflammation proteins in broiler chickens, but addition of an adsorbing agent
7 shifts the effects to the distal parts of the small intestine. *PLoS ONE* **2013**,
8
- 9 11. Abbes, S.; Ben Salah-Abbes, J.; Jebali, R.; Younes, R.B.; Queslati, R. Interaction of
10 Aflatoxin B1 and fumonisin B1 in mice causes immunotoxicity and oxidative stress: Possible
11 protective role using lactic acid bacteria. *Journal Immunotoxicol.* **2016**, 13, 46–54.
12
- 13 12. Li, D.; Ye, Y.; Lin, S.; Deng, L.; Fan, X.; Zhang, Y.; Deng, X.; Li, Y.; Haikuo, M.H.Y.
14 Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells in vitro: Cellcycle arrest,
15 oxidative stress, and apoptosis. *Environ Toxicology Pharmacology*. **2014**, 37, 141–149.
16
- 17 13. Domijan, A.M.; Gajski, G.; Jovanovic, I.N.; Geric, M.; Garaj-Vrhovac, V. In vitro
18 genotoxicity of mycotoxin ochratoxin A and fumonisin B (1) could be prevented by sodium
19 copper chlorophyllin-implication to their genotoxic mechanism. *Food Chemical*. **2015**, 170,
20 455–462.
21
- 22 14. Bracarense, A.P.F.R.L.; Lucioli, J.; Grenier, B.; Pacheco, G.D.; Molls, W.-D.; Schtzmayr,
23 G.; Oswald, I.P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction,
24 induces morphological and immunological changes in the intestine of swinelets. *Br. J. Nutr.*
25 **2012**, 107, 1776–1786.
- 26 15. Martínez-Cayuela, M. Oxygen free radicals and human disease. *Biochemie* **1995**, 77, 147-
27 161.
- 28 16. Grenier, B.; Bracarense, A.P.F.L.; Schwartz, H.E.; Trumel, C.; Cossalter, A.M.;
29 Schatzmayr, G.; Oswald, I.P. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin
30 B1 correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochem. Pharmacol.*
31 **2012**, 83, 1465–1473.
- 32 17. Wang, X.; Wu, Q.; Wan, D.; Liu, Q.; Chen, D.; Liu, Z.; Matinez-Larranaga, M.R.; Martinez,
33 M.A.; Anadon, A.; Yuan, Z. Fumonisin: Oxidative stress-mediated toxicity and metabolism in
34 vivo and in vitro. *Arch. Toxicol.* **2016**, 90, 81–101.
- 35 18. Antolovich, M, P. D.; Prenzler, E.; Patsalides, S.; McDonald, and K. Robards. Methods for
36 testing antioxidant activity. *The Analyst* **2002**, 127, 183–198.
- 37 19. Da Silva, E. O.; Gerez, J. R.; do Carmo Drape, T.; Bracarense, A. P. F. R. L. Phytic acid
38 decreases deoxynivalenol and fumonisin B1-induced changes on swine jejunal explants.
39 *Toxicology Reports*. **2014**, 1, 284–292.
40
- 41 20. Graf, E. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Radical Biology and Medicine*. **1990**, 8,
42 61–69.
43

- 1 21. Pacheco, G.D.; Silva, C.A.; Pinton, P.; Oswald, I.P.; Bracarense, A.P. Phytic acid protects
2 porcine intestinal epithelial cells from deoxynivalenol (DON) cytotoxicity. *Exp. Toxicol.*
3 *Pathol.* **2012**, *64*, 345–347.
- 4 22. Hou, Y.-J.; Zhao, Y.-Y.; Xiong, B.; Cui, X.-S.; Kim, N.-H.; Xu, Y.-X.; Sun, S.-C.
5 Mycotoxin-Containing Diet Causes Oxidative Stress in the Mouse. *PLoS ONE* **2013**, v. 8, n. 3,
6 p. e60374, 28 mar. <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0060374>>.
- 7 23. Guilloteau, P.; Zabielski, R.; Hammon, H. M.; Metges, C. C. Nutritional programming of
8 gastrointestinal tract development. Is the swine a good model for man? *Nutrition Research*
9 *Reviews* **2010**, Germany, v. 23, n. 1, p. 4-22.
- 10 24. Swindle, M. M.; Smith, A. C. Comparative and physiology of the swine. *Scandinavian*
11 *Journal of Laboratory Animal Science* **1998**, v. 25, p. 11- 21. Supplement 1.
- 12 25. Basso, K.M.; Bracarense, A.P.F.R.L. “Tissue Explants: A Rediscovered Model in Animal
13 Experimentation” *Semina: Ciências Agrárias* **2013**, 34, no. 6Supl2: 3951.
14 <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2013v34n6Supl2p3951>.
- 15
16 26. Bansal, D.; Ave, P.; Kerneis, S.; Frileux, P.; Boche, O.; Baglin, A. C.; Dubost, G.; Leguern,
17 A. S.; Prevost, M. C.; Bracha, R.; Mirelman, D.; Guille, N. N.; Labruye, R.E. An ex-vivo human
18 intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. *PLOS Neglected Tropical*
19 *Diseases*, New York. **2009**, 3, 1-11.
- 20
21 27. Gumprecht, L. A.; Beasley, V. R.; Weigel, R M.; Parker, H1 M.; Tumbleson, M. E.; Bacon,
22 C. W.; Meredith, F. L.; Haschek, W. M. Development of Fumonisin-Induced Hepatotoxicity
23 and Pulmonary Edema in Orally Dosed Swine: Morphological and Biochemical Alterations.
24 *Toxicologic Pathology*, **1998**, 26, 777–788.
- 25 28. Harrison, L.R.; Colvin, B.M; Greene, J.T; Newman, L. E.; Cole Jr. Pulmonary edema and
26 hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*.
27 *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **1990**, 2, 217–221.
- 28
29 29. Sharma, P. R.; Bhandari, N.; He Q. He, Riley, T. R.; Voss, A. K. Decreased fumonisin
30 hepatotoxicity in mice with a targeted deletion of tumor necrosis factor receptor 1. *Toxicology*
31 **2001**, v.159, 69-79.
- 32
33 30. Kaneko, J. J. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, ed. by J. J. Kaneko, Academic
34 Press, New York. **2008**, 385.
- 35
36 31. Casteel, S.W.; Turk, J. R.; Rottinghaus, G.E. Chronic effects of dietary fumonisin on the
37 heart and pulmonary vasculature of swine. *Fundamental and Applied Toxicology*. Orlando.
38 **1994**, 23, 518-524.
- 39
40 32. Meyer, Coles e Rich. *Veterinary laboratory medicine: Interpretation and diagnosis*.
41 Publishing company ROCA, p. 3-6, **1995**.
- 42 33. Rico, A. G.; Braun, J. P.; Benard, P. Tissue and blood gamma-glutamyltransferase
43 distribution in the pig. *Research in Veterinary Science*. **1977**, 23.

- 1 34. Suzuki, H.; Riley T. R. and Sharma P. R. Inducible nitric oxide has protective effect on
2 fumonisin B1 hepatotoxicity in mice via modulation of sphingosine kinase, *Toxicology*. **2007**,
3 229, 42–53.
4
- 5 35. Sharma, P. R.; Bhandari, N.; He Q. He, Riley, T. R.; Voss, A. K. Decreased fumonisin
6 hepatotoxicity in mice with a targeted deletion of tumor necrosis factor receptor 1. *Toxicology*.
7 **2001**, 159, 69-79.
8
- 9 36. Tennant, B. C. Hepatic function. In: Kaneko, J. J.; Harvey, J. W.; Bruss, M. L. *Clinical*
10 *biochemistry of domestic animals*. 5th ed. London: Academic Press, **1997**, 327-352.
11
- 12 37. Randall, K. J.; Turton, J.; Foster, J. R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review
13 of methods and applications. *Cell Biology and Toxicology* **2011**, London, v. 27, n. 4, p. 267-
14 284.
- 15 38. Abel, S.; Gelderblom, W.C.A. “Oxidative Damage and Fumonisin B1-Induce Toxicity in
16 Primary Rat Hepatocytes and Rat Liver in Vivo.” *Toxicology*. **1998**, 131, 121–31.
- 17 39. Hou, Y.-J.; Zhao, Y.-Y.; Xiong, B.; Cui, X.-S.; Kim, N.-H.; Xu, Y.-X.; Sun, S.-C.
18 Mycotoxin-Containing Diet Causes Oxidative Stress in the Mouse. *PLoS ONE*. **2013**,8.
19
- 20 40. Arumugam, T.; Pillay, Y.; Ghazi, T.; Nagiah, S.; Abdul, N.S.; Chuturgoon, A. A. Fumonisin
21 B1-induced oxidative stress triggers Nrf2-mediated antioxidant response in human
22 hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Mycotoxin Research*. **2019**, 35, 99-109.
23
- 24 41. Halliwell, B.; Clement, M. V.; Long, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. *Febs*
25 *Letters*. **2000**, 486, 10-13.
26
- 27 42. Lee, H.J.; Lee, S.A.; Choi, H. Dietary administration of inositol and/or inositol-6-phosphate
28 prevents chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. **2005**, 6, 41–
29 47.
- 30 43. Foster, S.R.; Dilworth, L.L.; Thompson, R.K.; Alexander-Lindo, R.L.; Omoruyi, F.O.
31 Effects of combined inositol hexakisphosphate and inositol supplement on antioxidant activity
32 and metabolic enzymes in the liver of streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Chem. Biol.*
33 *Interact*. **2017**, 275, 108–115.
- 34 44. Gelderblom, W.C.A., Snyman, S.D., Van der Westhuizen, L., Marasas, W.F.O.
35 Mitoinhibitory effect of fumonisin B1 on rat hepatocytes in primary culture. *Carcinogenesis*
36 **1995**,16, 625–631.
- 37 45. Basso, K.; Gomes, F.; Bracarense, A.P. Deoxynivalenol and fumonisin, alone or in
38 combination, induce changes on intestinal junction complexes and in E-cadherin expression.
39 *Toxins* **2013**, 5, 2341–2352.
- 40 46. Pinho-Ribeiro, F. A., M. S. N. Hohmann, S. M. Borghi, A. C. Zarpelon, C. F. S. Guazelli,
41 M. F. 8 Manchope, R. Casagrande, and W. A. Verri. Protective effects of the flavonoid
42 hesperidin 9 methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative
43 stress, cytokines 10 and NF-κB. *Chemico-Biological Interactions* **2015**, 228, 88–99.

- 1 47. Lushchak, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential targets for medical 47
2 interventions. *Journal of Amino Acids* **2012**, 1–26.
- 3 48. Sedlak, J.; Lindsay, R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups
4 in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* **1968**, 25, 192–205.
- 5 49. Hohmann, M. S. N., R. D. R. Cardoso, F. A. Pinho-Ribeiro, J. Cresswineio, T. M. Cunha,
6 J. C. Alves-Filho, R. V da Silva, P. Pinge-Filho, S. H. Ferreira, F. Q. Cunha, R. Casagrande,
7 and W. A. Verri. 2013. 5-lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen-induced
8 hepatotoxicity and 14 lethality. *BioMed Research International* **2013**, 627046.
- 9 50. Fattori, V., S. M. Borghi, C. F. S. Guazelli, A. C. Giroldo, J. Cresswineio, A. J. C.
10 Bussmann, L. 32 Coelho-Silva, N. G. Ludwig, T. L. Mazzuco, R. Casagrande, and W. A. Verri.
11 Vinpocetine reduces diclofenac-induced acute kidney injury through inhibition of oxidative
12 stress, apoptosis, cytokine production, and NF- κ B activation in mice. *Pharmacological*
13 *Research* **2017**, 120, 10–22.
- 14 51. Ferreira, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia.*
15 **2011**, 35, 1039-1042.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

8 CONCLUSÕES

- A utilização deste modelo experimental é promissora para estudos toxicológicos e os resultados do presente estudo indicam que os explantes hepáticos de suínos são adequados para avaliar os efeitos de substâncias tóxicas, mantendo a integridade celular no período de 4 horas e contribuiu com os 3 R's da experimentação animal (*Reduction, Replacement e Refinement*), pois utilizando tecidos de suínos de terminação, há redução do número de animais na experimentação e com base no fato de que os suínos são semelhantes aos humanos, os achados podem ser relevantes para esta espécie.
- Os biomarcadores hepáticos avaliados neste modelo mostraram que a FB₁ (100µM) promoveu incremento da atividade das enzimas hepáticas tanto para o GE1 quanto para o GE2, possivelmente por aumentar a permeabilidade dos hepatócitos. Porém para o acetaminofeno, os mecanismos de lesão hepática são altamente complexos e muitos eventos intracelulares e extracelulares estão envolvidos neste processo fisiopatológico, incluindo metabolismo do acetaminofeno, estresse oxidativo mitocondrial, disfunção celular, inflamação, além da regeneração hepática, que ainda precisam ser elucidados, utilizando este modelo experimental.
- O ácido fítico exerce efeitos benéficos sobre o explante hepático, modulando as alterações induzidas pelo FB₁ e acetaminofeno. Esses efeitos estão associados a uma resposta ao estresse oxidativo, incluindo possível capacidade antioxidante.
- O aumento da capacidade antioxidante hepática (GSH) no GE2 em ambos os experimentos, sugerem que leitões apresentam mecanismos de desintoxicação dependentes de glutatona, superior aos suínos de terminação (GE1) que tiveram aumento desta defesa antioxidante apenas com FB₁, comparada com IP6 e IP6+FB₁. Para o GE2, com acetaminofeno, houve elevação dos ensaios ABTS e FRAP, contribuindo também com a defesa antioxidante. Suínos de terminação (GE1), foram mais susceptíveis a lesões

1 do que leitões (GE2), devido à elevação de NBT (tetrazólio de nitroazul) no
2 grupo FB₁.

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23


24

1 • ANEXOS

2

3

Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina -UEL

 UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

0, _____
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 15/2019 Londrina, 14 de Fevereiro de 2019.

Prezado (a) professor (a)

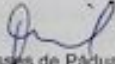
Em resposta ao pedido de adendo 13812.2017.19 referente ao projeto 14358.2015.95 "Avaliação dos produtos biotonic top 3 e biotronic top liquid sobre o desempenho e saúde intestinal de leitões desafiados com *Escherichia coli* K88" sob a responsabilidade de Ana Paula Frederico R. L. Bracarense e já previamente aprovado pelo OF. CIR. CEUA 152/2017, a CEUA-UEL certifica que o mesmo teve parecer **aprovado** em 12/02/2019.

O adendo solicita a eutanásia de 30 animais (Leitões) oriundos da fazenda escola da UEL, sendo que o pedido inicial era de 36 animais para avaliar características histológicas dos órgãos, fígado, baço, linfonodo mesentérico, pulmão, rim, jejuno e íleo. A alteração do período de execução do experimento com os animais para as datas 01/03/2019 a 11/04/2019 também foi aprovada.

Os procedimentos experimentais não serão modificados em relação ao protocolo inicialmente proposto.

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

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


Prof. Dr. Ulisses de Pádua Pereira
Vice -Coordenador da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a) Ana Paula F. R. L. Bracarense
Responsável pelo projeto
Depto de DMVP/CCA
Centro de Ciências Agrárias/CCA

Campus Universitário Rodovia Celso Garcia Cal (PR 445), km 289 - Fone (643) 3375-4000 FAXS - Fax 3328-4488 - Caixa Postal 18411 - CEP 86007-970 - Internet <http://www.uel.br>
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

4