



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ELISÂNGELA OLEGÁRIO DA SILVA

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO FÍTICO SOBRE
EXPLANTES JEJUNAIS DE SUÍNOS EXPOSTOS AO
DESOXINIVALENOL E FUMONISINA B1**

ELISÂNGELA OLEGÁRIO DA SILVA

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO FÍTICO SOBRE
EXPLANTES JEJUNAIS DE SUÍNOS EXPOSTOS AO
DESOXINIVALENOL E FUMONISINA B1**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Frederico
Rodrigues Loureiro Bracarense

Londrina
2014

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S586e Silva, Elisângela Olegário da.

Efeito protetor do ácido fítico sobre explantes jejunais de
suínos expostos ao desoxinivalenol e fumosina B1 /
Elisângela Olegário da Silva. – Londrina, 2014.

111 f. : il.

Orientador: Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Suínos – Doenças – Teses. 2. Ácido fítico – Teses. 3. Micotoxinas – Teses.
4. Jejunos – Teses. 5. Modelos animais em pesquisa – Teses. 6. Histologia
veterinária – Teses. I. Bracarense, Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa
de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619:636.4

ELISÂNGELA OLEGÁRIO DA SILVA

**EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO FÍTICO SOBRE EXPLANTES
JEJUNAIS DE SUÍNOS EXPOSTOS AO DESOXINIVALENOL E
FUMONISINA B1**

Dissertação apresentada ao Program de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Frederico
Rodrigues Loureiro Bracarense
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^o. Dr. Caio Abércio da Silva
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Elza Iouko Ida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de Fevereiro de 2014.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Anatomia Patológica Veterinária/DMVP/CCA/UEL em parceria com a Fazenda Escola e os Laboratórios de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Microbiologia Veterinária, Protozoologia e Reprodução Animal.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior)

CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico)

Fundação Araucária (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Paraná)

Dedico este trabalho ao meu esposo Lucas,
por todo amor, companheirismo, amizade,
paciência e incentivo.

AGRADECIMENTOS

*“...E aprendi que se depende sempre
De tanta, muita, diferente gente
Toda pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas.
É tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá.
É tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho
Por mais que pense estar...” (Caminhos do coração – Gonzaguinha.)*

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Paula F.R.L. Bracarense por ter me dado uma oportunidade e acreditado no meu potencial há sete anos atrás, e por continuar a me guiar no mundo da ciência até o presente momento. Pela paciência e ensinamentos durante toda esta trajetória. Pelos conselhos e palavras de incentivo nos momentos difíceis, nos erros e nos acertos. Por ser um exemplo de profissional e pessoa, tendo conquistado meu respeito e admiração. Por acima de tudo ser uma amiga com a qual sei que posso contar sempre.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos F. dos Reis e à Profa. Dra. Giovana W. di Santis pelos ensinamentos, discussões de casos, paciência e amizade durante toda a residência até presente momento.

Ao Prof. Dr. Selwyn A. Headley pelos ensinamentos, pelos casos interessantes, por estar sempre disposto em responder dúvidas patológicas.

Ao prof. Caio Abércio da Silva pelas discussões e colaborações nos diversos projetos desenvolvidos, principalmente com relação aos animais utilizados.

A profa. Dra. Elza Iouko Ida pela colaboração com o ácido fólico e discussões que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

À profa. Dra. Lucienne Giordano e ao técnico José Aldevino do Laboratório de Microbiologia por cederem a estrutura laboratorial para realização de parte do experimento.

À Juliana Rubira, Karina Basso, Eduardo Raele e Rogério Marcasso pela ajuda com a análise estatística, desenvolvimento experimental, cuidado dos suínos na Fazenda Escola e eutanásia dos animais respectivamente.

Aos residentes do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal: Edson Rios, João Paulo de Araújo, Juliana Pereira e Nayara da Silva pelo auxílio com a autoclavagem dos materiais para uso no experimento.

A minha família pelo incentivo e apoio em todas as etapas da minha vida.

Ao meu esposo, por estar ao meu lado, suportando as fases de estresse, se alegrando com meus acertos, me animando nos meus erros, pela cumplicidade, carinho, apoio e incentivo.

Às amigas professoras Graziela Kopinits, Roberta Toledo e Verônica Albuquerque pelo apoio e incentivo nessa minha nova fase profissional.

Aos amigos e companheiros de trabalho do Laboratório de Anatomia Patológica: Cláudia, Fernando, Isabela, Jéssica, José Carlos (Zé), Juliana, Karina, Kerriel, Letícia M. Letícia Y., Luciana, Mariana, Renata, Rogério, Thaís, Thalisie, Victor e Stela, pela companhia, amizade, incentivo e descontrações festivas.

Aos amigos e pós-graduandos, Ana Carolina (Miura), Jonatas, Luiz Daniel, Michele, Reginaldo e Sérgio, pelo incentivo, apoio e descontração nas horas mais difíceis.

Aos amigos Jaqueline, Natael e Mariana, que mesmo distantes me enviam energias positivas, incentivo e apoio.

À CAPES pela concessão de bolsa e ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal-UEL.

Ao CNPq e Fundação Araucária pelo auxílio financeiro.

À todos que estiveram presentes e contribuíram para a realização deste projeto.

“Nenhum problema pode ser resolvido pelo mesmo estado de consciência que o criou. É preciso ir mais longe. Eu penso várias vezes e nada descubro. Deixo de pensar, mergulho em um grande silêncio e a verdade me é revelada.”

(Albert Einstein)

SILVA, Elisângela Olegário da. **Efeito protetor do ácido fítico sobre explantes jejunais de suínos expostos ao desoxinivalenol e fumonisina B1**. 2014. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do ácido fítico (IP6) em explantes jejunais de suínos expostos ao desoxinivalenol (DON) e fumonisina B1 (FB1). Primeiramente, realizamos um experimento para avaliar o efeito de IP6 oriundo de arroz e milho em diferentes doses sobre explantes jejunais expostos à hipóxia. Para tanto, foram utilizados seis suínos com 24 dias de idade, os quais foram eutanasiados e em seguida, colhidos explantes jejunais com um punch de 8 mm de diâmetro e submetidos a nove tratamentos: controle (somente meio e cultura), meio + 0,5 mM IP6 (arroz/milho), meio + 1 mM IP6 (arroz/milho), meio + 2,5 mM IP6 (arroz/milho), meio + 5 mM IP6 (arroz/milho), incubados durante 4 horas sob agitação constante em estufa a 37 °C. Após esse período, os explantes foram fixados em solução de formalina tamponada a 10% e processados para realização do exame histológico e imuno-histoquímico para os anticorpos anti-Ki-67, anti-caspase-3 (Casp-3) e anti-ciclo-oxigenase-2 (Cox-2). Os explantes expostos às doses de 2,5 mM e 5 mM IP6 de arroz e milho evidenciaram melhor preservação da morfologia intestinal e altura de vilosidades, e diminuição significativa da proliferação celular, apoptose e expressão de Cox-2. No segundo experimento a metodologia foi similar ao primeiro, utilizando IP6 oriundo de arroz; os explantes colhidos foram submetidos aos tratamentos: controle (meio), DON (10 µM), FB1 (70 µM), DON (10 µM) +2,5 mM IP6, DON (10 µM) +5 mM IP6, FB1 (70 µM) + 2,5 mM IP6, FB1 (70 µM) +5mM IP6. Após a incubação os explantes foram processados para avaliação histológica e imuno-histoquímica para os anticorpos anti-E-caderina, anti-ki-67, anti-Casp-3, anti-p53 e anti-Cox-2. A presença de 2,5 mM e 5 mM de IP6 reduziu significativamente as alterações morfológicas induzidas pelas micotoxinas no jejuno. No entanto, não ocorreu diferença quanto à densidade de células calciformes nos diferentes tratamentos. A presença de 5 mM diminuiu significativamente a apoptose e a expressão de Cox-2 nos explantes expostos ao DON. As doses de 2,5 mM e 5 mM de IP6 reduziram significativamente a proliferação celular nos explantes expostos a DON e FB1. Não ocorreu diferença significativa entre os tratamentos na expressão de E-caderina e p-53. Os resultados obtidos por meio da avaliação histológica e imuno-histoquímica evidenciaram uma ação protetora do IP6, que se mostrou capaz de modular os efeitos tóxicos induzidos pelo DON e FB1 sobre o jejuno.

Palavras-chave: IP6. Micotoxinas. Técnica de explantes. Jejuno. Suínos. Modelo experimental.

SILVA, Elisângela Olegário da. **Protective effect of phytic acid on jejunal explants of swine exposed to deoxynivalenol and fumonisin B1**. 2014. 111p. Dissertation (Master in Animal Science) – Londrina State University, Londrina, 2014.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of phytic acid (IP6) on jejunal explants of pigs exposed to deoxynivalenol (DON) and fumonisin B1 (FB1). Firstly, we conducted an experiment to evaluate the effect of IP6 from rice and corn in different doses on jejunal explants exposed to hypoxia. For this purpose, six pigs 24 –days-old were euthanized and the jejunal explants were collected using a punch of 8 mm in diameter and submitted to nine treatments: control (culture medium), medium + 0.5 mM IP6 (rice/corn), 1 mM medium + IP6 (rice/corn) medium + 2.5 mM IP6 (rice/corn) medium + 5 mM IP6 (rice/corn) and incubated at 37 °C under orbital shaking. After the incubation period, the explants were fixed in 10% neutral buffered formalin and processed for the histological evaluation and immunohistochemistry exam using antibodies against Ki-67, caspase-3 (Casp-3) and cyclooxygenase-2 (Cox-2). The explants exposed to doses of 2.5 mM and 5 mM IP6 from rice and corn showed a significant intestinal morphology preservation and villus height, and significant decrease of cellular proliferation, apoptosis and expression of Cox-2. In the second experiment, we used similar methodology to the first experiment, using IP6 from rice; jejunal explants were collected and submitted to treatments: control (medium), DON (10 µM), FB1 (70 µM), DON (10 µM) + 2.5 mM IP6, DON (10 µM) + 5 mM IP6, FB1 (70 µM) + 2.5 mM IP6 and FB1 (70 µM) + 5 mM IP6. After incubation, the explants were processed for histological evaluation and immunohistochemistry exam using the antibodies against Ki-67, Casp-3, p53, Cox-2 E-cadherin. The presence of 2.5 mM and 5 mM IP6 showed significant decrease in the morphological changes induced by the mycotoxins in the jejunum. However, there was no difference in the density of goblet cells in the different treatments. The presence of 5 mM demonstrated significant decrease in apoptosis and the expression of Cox-2 on the explants exposed to DON. The doses of 2.5 mM and 5 mM IP6 presented significant reduce in the cell proliferation on the explants exposed to DON and FB1. There was no significant difference between the treatments in the expression of E-cadherin and p53. The present data provided by histologic and immunohistochemical analysis showed a protective action of IP6, which has been shown to modulate the toxic effects induced by DON and FB1 on the jejunum.

Keywords: IP6. Mycotoxins. Explants technique. Jejunum. Swine. Experimental model.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Estrutura do ácido fítico..... 32

ARTIGO 1. EFFECT OF PHYTIC ACID FROM RICE AND CORN ON MORPHOLOGY, CELL PROLIFERATION, APOPTOSIS AND CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN SWINE JEJUNAL EXPLANTS

Figure 1. Effect of IP6 from rice and corn on jejunum explants histology. **A-** Control with moderate lesions, villi atrophy (black arrow) and villi fusion (red arrows), H&E, bar 50 μ m. **B-** Jejunal explant incubated with 5 mM IP6, H&E 50 μ m. **C-** Histological score after examination according to the occurrence of lesions in explants submitted to IP6 from rice and corn. (AU-Arbitrary units). **D-** Villi height of explants submitted to IP6 from rice and corn. Values are mean height (μ m). Values are means with standard errors of the mean represented by vertical bars (n 6 animals). Mean values with unlike letters were significantly different ($P < 0.05$)..... 62

Figure 2. Effect of IP6 from rice and corn on jejunum explants cellular proliferation, apoptosis and Cox-2 expression. Immunohistochemistry using the immunoperoxidase method and hematoxylin counterstain. **A-** Positive cell immunostaining for Ki-67 in explants submitted to 2.5mM and 5 mM from rice and corn. Values are mean positive cells per field. **B-** Immunostaining for Ccasp3 in explants submitted to 2.5mM and 5 mM from rice and corn. Values are mean positive cells per field. Values are means with standard errors of the mean represented by vertical bars (n 6 animals). **C-** Immunostaining for Cox-2 in explants submitted to IP6 from rice. **D.** Immunostaining for Cox-2 in explants submitted to IP6 from rice. Values are expressed as percentage of positive and negative immunostaining fields represented

by vertical bars (n 6 animals). Unlike letters were significantly different (P<0.05)..... 64

Figure 3. Effect of IP6 on jejunum explants on cellular proliferation, apoptosis and Cox-2 expression. Nuclear immunohistochemical staining for Ki-67 and cytoplasmic immunohistochemical staining for Ccasp3. **A.** Ki-67, Control, (nuclear staining, arrows), bar 25 µm. **B.** Ki-67, IP6 5 mM from rice, (nuclear staining, arrows), bar 25 µm **C-** Ccasp3, Control, bar 25 µm (cytoplasmic staining, arrows). **D.** Ccasp3, IP6 5 mM from rice, bar 25 µm (cytoplasmic staining, arrows). 65

ARTIGO 2. Phytic acid decreases deoxynivalenol and fumonisin B1-induced changes on swine jejunal explants

Figure 1. The effect of IP6 on the histological morphology of jejunum explants exposed to DON and FB1. **DON(1)**-DON alone; **DON(2)**- DON plus 2.5 mMIP6; **DON(3)**-DON plus 5 mM IP6; **FB1(1)**-FB1 alone; **FB1(2)**-FB1 plus 2.5 mM IP6; **FB1(3)**-FB1 plus 5 mM IP6. **A-** The effect of IP6 on the lesional score of jejunum explants exposed to DON and FB1 (Arbitrary Units). **B-** The effect of IP6 on the villi height of jejunum explants exposed to DON and FB1 (µm). Mean values with unlike letters were significantly different (p≤0.05). **C-** Control treatment. H&E, bar 100 µm. **D-** DON group, villi atrophy and loss of the apical enterocytes. H&E, bar 100 µm. **E-** DON group, severe villi fusion. H&E, bar 100 µm. **F-** 96 DON plus 5 mM IP6. H&E, bar 100 µm. **G-** FB1 group, villi atrophy, fusion and loss of the apical enterocytes. H&E, bar 50 µm. **H-** FB1 plus 5 mM IP6. H&E, bar 50 µm. 95

Figure 2. The effect of IP6 on the cell proliferation and apoptosis of jejunum explants exposed to DON and FB1 and immunohistochemistry exam for Ccasp3 with cytoplasmic immunostaining (dark brown). **DON(1)**-DON alone; **DON(2)**- DON plus 2.5 mMIP6; **DON(3)**-DON plus 5 mM IP6; **FB1(1)**-FB1 alone; **FB1(2)**-FB1 plus 2.5 mM IP6; **FB1(3)**-FB1 plus 5 mM IP6. **A-** The effect of IP6 on Ki-67 expression of jejunum explants exposed to DON and FB1. **B-** The effect of IP6 on caspase-3 expression

of jejunum explants exposed to DON and FB1 (μm); Mean values with unlike letters were significantly different ($p \leq 0.05$). **C**- Control treatment. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **D**- FB1 alone group. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **E**- DON alone group. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **F**- DON plus 5 mM IP6. Immunoperoxidase method, bar 25 μm 97

Figure 3. The effect of IP6 on cyclooxygenase and cell adhesion protein expression in jejunum explants exposed to DON and FB1 (percentage) and immunohistochemistry exam for Cox-2 with cytoplasmic immunostaining (dark brown/arrows). **DON(1)**-DON alone; **DON(2)**-DON plus 2.5 mMIP6; **DON(3)**-DON plus 5 mM IP6; **FB1(1)**-FB1 alone; **FB1(2)**-FB1 plus 2.5 mM IP6; **FB1(3)**-FB1 plus 5 mM IP6. **A**- The effect of IP6 on the Cox-2 expression in jejunum explants exposed to DON and FB1. **B**- The effect of IP6 on E-cadherin expression in jejunum explants exposed to DON and FB1 (μm). Percentage values with unlike letters were significantly different ($p \leq 0.05$). **C**- Control treatment. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **D**- DON alone group. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **E**- DON group plus 5 mM IP6. Immunoperoxidase method, bar 25 μm 99

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1.	Conteúdo de ácido fítico em cereais	31
Tabela 2.	Ação antineoplásica do IP6 sobre em diferentes modelos experimentais	33
Tabela 3.	Ação antineoplásica do IP6 sobre em diferentes modelos experimentais (continuação)	34
Tabela 4.	Ação do ácido fítico em diversas condições patológicas.....	35

ARTIGO 1. EFFECT OF PHYTIC ACID FROM RICE AND CORN ON MORPHOLOGY, CELL PROLIFERATION, APOPTOSIS AND CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN SWINE JEJUNAL EXPLANTS

Table 1.	Histological criteria score used to establish the jejunal lesional score	58
-----------------	--	----

ARTIGO 2. Phytic acid decreases deoxynivalenol and fumonisin B1-induced changes on swine jejunal explants

Table 1.	Histological criteria score used to establish the jejunal lesional score	93
-----------------	--	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
	Referências	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
	Ácido fítico: de fator antinutricional à múltipla proteção de sistemas orgânicos	14
	RESUMO	14
	ABSTRACT	14
	INTRODUÇÃO	15
	DESENVOLVIMENTO	15
	Propriedades químicas e biológicas	15
	Absorção, metabolismo e funções intracelulares	16
	Ação anticarcinogênica	18
	Ação em outras condições patológicas	19
	Ação contra micotoxinas	19
	Ação na conservação de alimentos	20
	CONCLUSÃO	20
	AGRADECIMENTOS	20
	REFERÊNCIAS	21
	MICOTOXINAS	36
	Introdução	36
	Fumonisina B1 (FB1)	36
	<i>Metabolismo e Modo de Ação</i>	37
	<i>Intoxicação Aguda em Suínos</i>	38
	<i>Intoxicação Crônica em Suínos</i>	39
	<i>Ação Gastrointestinal</i>	39
	Desoxinivalenol (DON)	40
	<i>Metabolismo e Modo de Ação</i>	41
	<i>intoxicação Aguda em Suínos</i>	42
	<i>Intoxicação Crônica em Suínos</i>	43
	<i>Ação Gastrointestinal</i>	43
	Suíno como modelo experimental e técnica de explantes	44
	REFERÊNCIAS	46

3.	OBJETIVOS	52
	OBJETIVO GERAL.....	52
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4.	ARTIGO 1 - EFFECT OF PHYTIC ACID FROM RICE AND CORN ON MORPHOLOGY, CELL PROLIFERATION, APOPTOSIS AND CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN SWINE JEJUNAL EXPLANTS	53
	ABSTRACT	53
	RESUMO	54
	INTRODUCTION	55
	MATERIAL AND METHODS	56
	Animals	56
	Phytic acid	57
	Jejunal explants technique	57
	Histological assessment	58
	Immunohistochemical assessment	58
	Statistical analysis	59
	RESULTS AND DISCUSSION	59
	CONCLUSION	67
	ACKNOWLEDGMENT	67
	REFERENCES	68
5.	ARTIGO 2 - Phytic acid decreases deoxynivalenol and fumonisin B1-induced changes on swine jejunal explants	71
	Abstract	71
1.	Introduction	72
2.	Material and Methods	74
2.1.	<i>Animals</i>	74
2.2.	<i>Phytic acid</i>	74
2.3.	<i>DON and FB1 mycotoxins</i>	75
2.4.	<i>Jejunal explants technique</i>	75
2.5.	<i>Histological assessment</i>	76

2.6.	<i>Immunohistochemical assessment</i>	76
2.7.	<i>Statistical analysis</i>	77
3.	Results	78
3.1.	<i>Effect of IP6 on the histology and morphometry of jejunal explants exposed to DON and FB1 mycotoxins</i>	78
3.2.	<i>Effect of IP6 on cell proliferation and apoptosis in jejunal explants exposed to DON and FB1 mycotoxins</i>	79
3.3.	<i>Effect of IP6 on the expression of junction proteins and cyclooxygenase-2 on jejunal explants</i>	80
4.	Discussion	80
	Acknowledgment	84
	References	85
	 CONCLUSÕES	 100
	 APÊNDICES	 101
	APÊNDICE A – Comissão de Ética no uso de Animais	101
	 ANEXOS	 102
ANEXO A -	Normas para publicação da Revisão de Literatura- Ciência Rural	102
ANEXO B –	Normas para publicação do Artigo 1- Ciência e Agrotecnologia	105
ANEXO C –	Normas para publicação do Artigo 2- Toxicology	108

1 INTRODUÇÃO

Há uma crescente preocupação mundial com a qualidade dos alimentos, envolvendo tanto aspectos nutricionais como os de contaminações. Estudos sobre os chamados alimentos nutracêuticos mostram a importância de uma alimentação saudável e balanceada na prevenção e terapêutica de diversas doenças (PADILHA; PINHEIRO, 2004; MORAES; COLLA, 2006). Até a década de 80, o ácido fítico, antioxidante natural encontrado principalmente em cereais, era considerado um fator antinutricional, devido sua ação de quelação com diversos minerais como cobre, ferro, zinco e cálcio (GRAF; EATON, 1985). No entanto, nas últimas duas décadas, diversos estudos evidenciaram sua ação na prevenção de várias condições patológicas e cânceres, principalmente por sua potente ação antioxidante, evidenciada na quelação com o Fe^{3+} , inibindo a reação de Fenton e, portanto, impedindo a formação de radicais livres (GRAF; EATON 1990; VUCENIK; SHAMSUDDIN, 2006). Apesar de inúmeros estudos evidenciarem a ação protetora do IP6, pouco se sabe sobre as interações e sinalizações intracelulares moduladas por esta substância, e sua possível ação protetora no trato gastrointestinal contra agentes infecciosos e toxinas.

O trato gastrointestinal é a principal barreira física e imunológica contra microrganismos e toxinas veiculados com a alimentação (OSWALD et al., 2003; BOUHET; OSWALD, 2005). No entanto, mesmo possuindo um complexo sistema de defesa, o intestino delgado é um dos principais alvos da ação tóxica de diversas micotoxinas, destacando-se a fumonisina B1 (FB1) e o desoxinivalenol (DON) (BRACARENSE et al., 2012; GRENIER et al., 2013). Neste sentido, nosso grupo de pesquisa busca elucidar os mecanismos de ação destas micotoxinas, FB1 e DON, sobre a morfologia e imunologia intestinal. Além de compreender melhor a patogênese da intoxicação por FB1 e DON, pesquisamos mecanismos ou substâncias que possam inativar ou minimizar esses efeitos lesivos sobre o intestino. Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a ação do IP6 sobre explantes jejunais de

suínos expostos ao DON e FB1.

Referências

BOUHET, S.; OSWALD, I.P. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p.199-209, 2005.

BRACARENSE, A-P. F.L.; LUCIOLI, J.; GRENIER, B., PACHECO, G.D.; MOLL, W-D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I.P. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 10, p. 1776-1786, 2012.

GRAF, E.; EATON, J.W. Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate? **Cancer**, v. 56, p. 717-718, 1985.

GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 61-69, 1990.

GRENIER, B.; BRACARENSE, A.P.; SCHWARTZ, H.E.; LUCIOLI, J.; COSSALTER, A.M.; MOLL, W.D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I.P. Biotransformation approaches to alleviate the effects induced by *Fusarium* mycotoxins in swine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 6711-6719, 2013.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p.109-122, 2006.

PADILHA, P.C.; PINHEIRO, R.L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 50, p. 251-260, 2004.

OSWALD, I.P. et al. Mycotoxin fumonisin B1 increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p. 5870- 5874, 2003.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.M. Protection against cancer by dietary IP6 and Inositol. **Nutrition and Cancer**, v. 55, p. 109-125, 2006.

2 REVISÃO DE LITERATURA

ÁCIDO FÍTICO: DE FATOR ANTINUTRICIONAL À MÚLTIPLA PROTEÇÃO DE SISTEMAS ORGÂNICOS*

PHYTIC ACID: FROM ANTI-NUTRITIONAL FACTOR TO PROTECTION MULTIPLE OF ORGANIC SYSTEMS

RESUMO

Diversos estudos demonstram o benefício dos antioxidantes naturais na saúde e conservação de alimentos. O ácido fítico (IP6) é um antioxidante natural encontrado principalmente em cereais e vegetais e, foi considerado por muito tempo como antinutricional. No entanto, estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam sua ação benéfica na prevenção e terapêutica de diversas condições patológicas e cânceres. Apesar dos inúmeros benefícios do IP6, as sinalizações e interações intracelulares mediadas por este antioxidante permanecem pouco conhecidas. A presente revisão apresenta os principais aspectos químicos, biológicos do IP6 e sua ação na prevenção e terapêutica de diversas doenças.

Palavras-chave: IP6, antioxidante, efeito protetor.

ABSTRACT

Several studies have shown the benefit of natural antioxidants in health and food preservation. The phytic acid (IP6) is a natural antioxidant present mainly in cereals and vegetables and it was considered for a long period as antinutrient. However, studies *in vitro* and *in vivo* have been demonstrated its beneficial effect in the prevention and treatment of several pathological conditions and cancer. Despite the numerous benefits of IP6, signs and intracellular interactions mediated by this antioxidant remains poorly understood.

*Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência Rural

This review presents the main chemical and biological aspects of IP6 and its action in the prevention and treatment of various diseases.

Key words: IP6, antioxidant, protect effect.

INTRODUÇÃO

O IP6 é um antioxidante natural encontrado em cereais, vegetais, nozes e óleos naturais, compondo cerca de 1-5% do peso e 60-90% do fósforo presente nas sementes (GRAF & EATON, 1990). A Tabela 1 ilustra a percentagem de ácido fítico presente nos cereais mais utilizados para alimentação humana e animal.

Por muito tempo o ácido fítico foi visto apenas como componente antinutricional devido sua capacidade de quelação com diversos minerais como ferro, cobre, zinco e cálcio, dificultando suas absorções no trato gastrointestinal (GRAF & EATON, 1990). No entanto, nas últimas décadas estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado seu efeito protetor em diversas condições patológicas e cânceres (VUCENIK & SHAMSUDDIN, 2006; MATEJUK & SHAMSUDDIN, 2010). Esse efeito protetor está ligado diretamente à sua ação antioxidante, no entanto, pouco se conhece sobre as outras possíveis interações e sinalizações deste ácido com as células do organismo humano e animal.

DESENVOLVIMENTO

Propriedades químicas e biológicas

O ácido fítico 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 & 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- hexafostato). O agrupamento dos fosfatos nas posições 1, 2 e 3 (axial-equatorial-axial) é único no IP6 (Figura 1), 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 & SHAMSUDDIN, 2006). Além disso, exibe uma elevada afinidade com os seguintes cátions polivalentes em ordem decrescente de estabilidade: $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Fe}^{3+} > \text{Ca}^{2+}$. A quelação com os minerais é dependente de diversos fatores, dentre estes, a proporção fitato: metal e pH (GRAF & EATON, 1990).

Durante a estocagem, fermentação, germinação e digestão dos cereais, o IP6 pode ser desfosforilado em ésteres fosfóricos de mio-inositol menores (IP5, IP4, IP3, IP2 e IP1) pela ação de fitase endógena ou pela hidrólise enzimática com fitase exógena (BURBANO et al., 1995). O inositol é um nutriente essencial, membro da família de vitaminas B e conjugado com os lipídios e está presente principalmente nas membranas celulares na forma de fosfatidilinositol. As células dos mamíferos respondem a diversos estímulos extracelulares vindos do ambiente, de outras células e por meio da ativação da fosfolipase C, a qual hidrolisa o fosfatidilinositol 4,5-bifostato, gerando inositol 1,4,5-P3 (IP3) e 1,2 diacilglicerol (BERRIDGE & IRVINE, 1989). Dentro das células, o IP3 pode servir como um precursor para formação de outros inositol fosfatos como IP4, IP5 e IP6, portanto as células possuem em seu interior IP6 e as formas desfosforiladas menores (IP1-5) (SHAMSUDDIN, 1999).

Absorção, metabolismo e funções intracelulares

Suínos e humanos apresentam características similares quanto à degradação e absorção do IP6, que ocorre em sua maior parte no estômago, porção superior do intestino delgado e cólon (SCHLEMMER et al., 2001). Tal similaridade faz com que o suíno seja o modelo experimental mais indicado no estudo da ação do IP6 sobre cânceres, doenças inflamatórias e

outras patologias, quando comparado a ratos e camundongos.

Animais monogástricos como suínos e aves não possuem um sistema de enzimas eficiente na utilização do fósforo fítico da dieta, sendo necessária a suplementação com fitase microbiana e fósforo inorgânico (SELLE & RAVINDRAN, 2007). Além, disso o IP6 tem sido considerado um antinutriente que pode vir a interferir na biodisponibilidade de ferro, cálcio e cobre (SELLE et al., 2000). No entanto, estudos indicam que a adição de IP6 na dieta de suínos inibe a oxidação da carne, não interfere na performance de crescimento, rendimento de carcaça e níveis séricos de ferro (HARBACH et al., 2007; MONTEIRO, 2013). A adição de ácido cítrico na ração aumenta a utilização do fósforo fitato (RAFACZ-LIVINGSTON et al., 1999) e portanto, pode diminuir a necessidade de suplementação com fitase e fósforo inorgânico.

Pressupunha-se que o IP6 por ser eletricamente negativo e altamente hidrofílico, não penetraria à membrana celular. No entanto, estudos demonstraram que o IP6 pode adentrar nas células por meio de desfosforilação ou por pinocitose (FERRY et al., 2002). A existência de receptores e proteínas de ligação para inositol polifosfatos indicaram sua importância no controle de várias funções celulares, como canais de íons e tráfego de proteínas (SHEARS, 1996), endocitose (ZI et al., 2000), exocitose (EFANOV et al., 1997), maturação de oócitos (JI et al., 1989), divisão e diferenciação celular (MENNITI et al., 1993), exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma (YORK et al., 1999), reparo do DNA (MA & LIEBER, 2002) e envelopamento de proteínas (MACBETH et al., 2005). Os múltiplos inositol fosfatos mostraram um complexo padrão de interação no ciclo de fosforilação e desfosforilação na renovação do *pool* de inositol fosfato intracelular (SEEDS et al., 2005). O IP6 e IP5 estão presentes no interior das células em quantidade superior aos demais ésteres fosfóricos (IP4, IP3, IP2 e IP) e apresentaram uma elevada capacidade de quelação com minerais (SANDBERG et al., 1989). Os IP3 e IP4 apresentaram importante papel na sinalização

celular, regulação do funcionamento, crescimento e diferenciação das células (BERRIDGE & IRVINE, 1989).

O IP6 tem a capacidade de formar complexos insolúveis com os minerais, proteínas, enzimas e amido, podendo interferir na absorção de ferro, zinco, cálcio e magnésio, principalmente em grupos de pessoas com maior exigência nutricional como crianças e mulheres jovens (PRYNNE et al., 2010). No entanto, alguns estudos sugeriram que o IP6 não exerceu nenhum efeito significativo na biodisponibilidade de minerais em pessoas que ingerem dietas balanceadas (FORBES et al., 1984; HUNT et al., 1987).

Ação anticarcinogênica

Estudos *in vitro* e *in vivo* avaliaram a ação do IP6 sobre diversos tipos de cânceres como observado nas Tabelas 2 e 3. Os efeitos de prevenção e inibição do desenvolvimento tumoral estão ligados principalmente à capacidade do IP6 modular a diferenciação, proliferação e apoptose das células neoplásicas (VUCENIK et al., 1998c). Essa proteção anticarcinogênica do IP6 é devida principalmente a sua ação de inibir a formação de radicais livres de oxigênio como resultado da inibição da reação de Fenton pela quelação com o ferro (GRAF & EATON, 1985). Além disso, estudos evidenciaram que o IP6 diminuiu a expressão do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), mantém a célula na fase G0/G1, ativa a caspase-3 e a expressão do p53 e inibe a ativação das *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) (SAIED & SHAMSUDDIN, 1998; EL-SHARBINY et al., 2001; FERRY et al., 2002; CHOLEWA et al., 2008).

Alguns estudos clínicos sugeriram que o IP6 potencializou a ação dos medicamentos quimioterápicos e minimizou seus efeitos colaterais em pessoas com câncer de mama e cólon (DRUZIJANIC et al., 2004; BACIC et al., 2010). A ingestão diária de 1 a 2 g de IP6 teria efeito profilático no desenvolvimento do câncer e a ingestão de 8 a 12 g/dia seria indicada na terapêutica antitumoral (VUCENIK & SHAMSUDDIN, 2006).

Ação em outras condições patológicas

Os efeitos protetores do IP6 têm sido demonstrados na prevenção e tratamento de diversas condições patológicas (Tabela 4). Os efeitos protetivos do IP6 em diferentes patologias estão relacionados à sua ação antioxidante pela quelação com o ferro, supressão da formação de radicais livres de oxigênio e quelação com Ca^{2+} . Estudos evidenciaram sua ação em inibir a peroxidação lipídica no cólon de ratos (NELSON et al., 1989), camundongos (SINGH et al., 1997) e suínos (PORRES et al., 1999), afetando a atividade da glutathione peroxidase e da catalase. Além disso, o IP6 modula as funções do sistema imune, aumentando a atividade das células *natural killer*, regulando a ação dos neutrófilos e diminuindo a expressão de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias (CHOLEWA et al., 2008). Interessante observar que no estudo da doença de Parkinson (XU et al., 2008), o IP6 diminuiu a apoptose dos neurônios, diferindo da sua ação nas células tumorais, em que induz a apoptose das mesmas. Tais resultados demonstraram que o IP6 modulou a apoptose, induzindo-a ou inibindo-a, com o intuito de proteger as células e prevenir o desenvolvimento das doenças. Em estudo prévio, o IP6 teve efeito protetor contra as alterações morfológicas na mucosa intestinal de suínos induzidas pela hipóxia celular, além de diminuir a proliferação celular, a apoptose e a expressão de ciclooxigenase-2 (Cox-2) (dados não publicados).

Ação contra micotoxinas

As micotoxinas são contaminantes de alimentos, principalmente cereais, que causam significativas perdas econômicas e risco à saúde de humanos e animais (RODRIGUES & NAEHRER, 2012). ABU EL-SAAD & MAHMOUD (2009) observaram que a adição de ácido fítico na dieta de ratos diminuiu significativamente as alterações histológicas e reprodutivas causadas pela aflatoxina B1 no testículo. PACHECO et al. (2012a) evidenciaram que o ácido fítico protegeu a integridade da membrana citoplasmática de células intestinais contra a ação lesiva do desoxinivalenol (DON). Nosso grupo de pesquisa busca

elucidar os mecanismos da patogênese dos efeitos tóxicos do DON e FB1, além disso, pesquisamos mecanismos ou substâncias que possam inativar ou minimizar esses efeitos lesivos sobre a morfologia e a imunologia do intestino. Em estudo recente, observamos que o ácido fítico diminuiu significativamente as alterações morfológicas induzidas pelas micotoxinas fumonisina B1 (FB1) e desoxinivalenol (DON) no jejuno de suínos. Além disso, reduziu a proliferação celular, a apoptose e a expressão de Cox-2, preservando a viabilidade celular intestinal (dados não publicados).

Ação na conservação de alimentos e subprodutos da produção animal

A busca crescente por alimentos de melhor qualidade faz com que os antioxidantes naturais como vitamina E (tocoferol), selênio, vitamina C (ácido ascórbico) e IP6 sejam cada vez mais estudados e empregados na indústria alimentícia (RAMALHO & JORGE, 2006). O ácido fítico tem demonstrado ser um excelente conservante de sucos (DU et al., 2012) e produtos cárneos (GHIRETTI et al., 1997; PACHECO et al., 2012b), inibindo a oxidação, preservando sua qualidade e aumentando seu tempo de prateleira.

CONCLUSÃO

Os efeitos protetores do ácido fítico têm sido demonstrados em diversas condições patológicas, cânceres e intoxicações. Está bem esclarecido seu efeito antioxidante na inibição da produção de radicais livres e, apesar de novos estudos evidenciarem ações intracelulares do IP6, pouco se sabe sobre as modulações das sinalizações intracelulares exercidas por esse antioxidante. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar as funções protetoras do IP6 e sua aplicabilidade na prevenção e terapêutica de doenças.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho

Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) processo 474691/2012-8 e Fundação Araucária.

REFERÊNCIAS:

ANEKONDA, T.S. et al. Phytic acid as a potential treatment for Alzheimer's pathology: evidence from animal and *in vitro* models. **Journal of Alzheimer's Diseases**, v. 23, p. 21-35, 2011. Disponível: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3021000/> >. Acesso em: 10 de Outubro de 2013. doi: 10.3233/JAD-2010-101287.

ABU EL-SAAD, A.S.; MAHMOUD, H.M. Phytic acid exposure alters aflatoxin B1-induced reproductive and oxidative toxicity in albino rats (*Rattus norvegicus*). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n.3, p. 331-334, 2009. Disponível: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2722202/>. Acesso em: 10 de Outubro de 2013. doi: 10.1093/ecam/nem137.

BACIC, I. et al. Efficacy of IP6+inositol in the treatment of breast cancer patients receiving chemotherapy: prospective, randomized, pilot clinical study. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, p. 1-5, 2010.

BERRIDGE, M.J.; IRVINE, R.F. Inositol phosphates and cell signaling. **Nature**, v. 341, p. 197-205, 1989.

BOZSIK, A. et al. Molecular mechanism for the antitumor activity of inositol hexakisphosphate (IP6). **Cancer Genomics Proteomics**, v. 4, n.1, p. 43-51, 2007. Disponível: <<http://cgp.iiarjournals.org/content/4/1/43.long>>. Acesso em: 16 de Outubro de 2013.

BURBANO, C. et al. Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. **Food Chemistry**, v. 52, p. 321-325, 1995.

CHALLA, A. et al. Interactive suppression of aberrant crypt foci induced by azoxymethane in rat colon by phytic acid and green tea. **Carcinogenesis**, v. 18, p. 2012-2016, 1997.

CHOLEWA, K. et al. The influence of phytic acid on TNF-alpha and its receptor genes expression in colon cancer Caco-2 cells. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 65, p. 75-79, 2008.

CURHAN, G.C. et al. Dietary factors and the risk of incident kidney stone in younger women: Nurses' Health Study II. **Archives of Internal Medicine**, v. 164, n. 8, p. 885-891, 2004. Disponível: <<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=216978>>. Acesso em: 05 de Novembro de 2013. doi: 10.1001/archinte.164.8.885.

DELILIERIS, L.G. et al. Effects of inositol hexaphosphate (IP6) on human normal and leukaemia hematopoietic cells. **British Journal of Haematology**, v. 117, p. 577-587, 2002.

DU, Y. et al. Efficacy of phytic acid as an inhibitor of enzymatic and non-enzymatic browning in apple juice. **Food Chemistry**, v. 135, p. 580-582, 2012.

DRUZIJANIC, N. et al. IP6 +inositol as adjuvant to chemotherapy of colon cancer: our clinical experience. **Anticancer Research**, v. 24, p. 3474, 2004.

EFANOV, A.M. et al. Inositol hexakisphosphate stimulates non-Ca²⁺-mediated and primers Ca²⁺-mediated exocytosis of insulin by activation of protein kinase C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, p. 4435-4439, 1997. Disponível: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20740/>>. Acesso em: 20 de Outubro de 2013.

EL-SHARBINY, Y. et al. G0/G1 arrest and S phase inhibition of human cancer cell lines by inositol hexaphosphate (IP6). **Anticancer Research**, v. 21, p. 2393-2404, 2001.

FARIA, O.L.V. et al. Remoção de fósforo de efluentes da parboilização de arroz por absorção biológica estimulada em reator em batelada sequencial (RBS). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 309-317, 2006. Disponível: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s0101-20612006000200013&script=sci_arttext. Acesso em: 04 de Fevereiro de 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000200013>.

FERRY, S. et al. Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibition the Akt/NFkB-mediated cell survival pathway. **Carcinogenesis**, v. 23, p. 2031-2041, 2002.

FORBES, R.M. et al. Effects of dietary phytate, calcium and magnesium levels on zinc bioavailability to rats. **Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1421-1425, 1984. Disponível: <<http://jn.nutrition.org/content/114/8/1421.long>>. Acesso em: 07 de Novembro de 2013,

GHIRETTI, G.P. et al. Comparative evaluation of some antioxidants in salame Milano and mortadela production. **Meat Science**, v. 47, p.167-176, 1997.

GRAF, E.; EATON, J.W. Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate? **Cancer**, v. 56, p. 717-718, 1985.

GRAF, E.; EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 61-69, 1990.

GRASES, F. et al. Effects of phytic acid on renal stone formation in rats. **Scandinavian Journal of Urology and Nephrology**, v. 32, n.4, p. 261-265, 1998.

GRASES, F. et al. Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p.136-142, 2006.

GRASES, F. et al. Role of phytate and osteopontin in the mechanism of soft tissue calcification. **Journal of Nephrology**, v. 21, p. 768-775, 2008.

GUPTA, K.P. et al. Suppression of DMBA-induced mouse skin tumor development by inositol hexaphosphate and its mode of action. **Nutrition and Cancer**, v. 46, p. 66-72, 2003.

HARBACH, A.P.R. et al. Dietary corn germ containing phytic acid prevents pork meat lipid oxidation while maintaining normal animal growth performance. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1630-1633, 2007.

HIROSE, M. et al. Inhibition of mammary gland carcinogenesis by green tea catechin and other naturally occurring antioxidants in Sprague-Dawley rats pretreated with 7, 12-dimethylbenz [α]anthracene. **Cancer Letters**, v. 83, p. 149-156, 1994.

HUANG, C. et al. Inositol hexaphosphate inhibits cell transformation and activator protein 1 activation by targeting phosphatidylinositol-3' kinase. **Cancer Research**, v. 57, p. 2873-2878, 1997.

HUNT J.R. et al. Dietary conditions influencing relative zinc availability from foods to the rat and correlations with in vitro measurements. **Journal of Nutrition**, v. 117, p. 1913-1923, 1987. Disponível: <<http://jn.nutrition.org/content/117/11/1913.long>>. Acesso em: 25 de Novembro de 2013.

JI, H. et al. Metabolism of inositol pentakisphosphate to inositol hexakisphosphate in *Xenopus laevis* oocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, p. 20185-20188, 1989. Disponível: <http://www.jbc.org/content/264/34/20185.long>. Acesso em: 22 de Setembro de 2013.

KAMP, D.W. et al. Phytic acid, an iron chelator, attenuates pulmonary inflammation and fibrosis in rats after intratracheal instillation of asbestos. **Toxicologic Pathology**, v. 23, p. 689-695, 1995. Disponível: <<http://tpx.sagepub.com/content/23/6/689.long>>. Acesso em: 15 de Agosto de 2013. doi: 10.1177/019262339502300606.

KARMAKAR, S. et al. Molecular mechanism of inositol hexaphosphate-mediated apoptosis in human malignant Glioblastoma T98 cells. **Neurochemical Research**, v. 32, p. 2094-2102, 2007.

KIM, SM. et al. Modulatory effect of rice bran and phytic acid on glucose metabolism in high fat-fed C57BL/6N mice. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v.47, p. 12-17, 2010. Disponível: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2901758/>. Acesso em: 03 de Novembro de 2013. doi: 10.3164/jcfn.09-124.

LEE, H.J. et al. Dietary administration of inositol and/or inositol-6-phosphate prevents

chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.6, p. 41-47, 2005.

MA, Y; LIEBER, M.R. Binding of inositol hexphosphate (IP6) to Ku but not to DNA-PKcs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 10756-10759, 2000.

MACBETH, M.R. et al. Inositol hexakisphosphate is bound n th ADAR2 core and required for RNA editing. **Science**, v. 309, p. 1534-1539, 2002.

MATEJUK, A.; SHAMSUDDIN, A. IP6 in cancer therapy: past, present and future. **Current Cancer Reviews**, v. 6, p. 1-12, 2010.

McMILLAN, B. et al. Dietary influence on pancreatic cancer growth by catechin and inositol hexaphosphate. **Journal of Surgical Research**, v. 141, p. 115-119, 2007.

MENNITI, F.S. et al. Inositol hexaphosphates and cell signaling: new view of InsP5 and InsP6. **Trends in Biochemical Science**, v. 18, p. 53-65, 1993.

MONTEIRO, R.T. **Avaliação do ácido fítico e do ferro inorgânico dietéticos sobre as características de desempenho, carcaça e qualidade da carne suína**. 2013. 105 f. Tese (Doutorado). Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina.

NICKEL, K.P.; BELURY, M.A. Inositol hexaphosphate reduces 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced ornithine decarboxylase independent of protein kinase C isoform expression in keratinocytes. **Cancer Letters**, v. 40, p. 105-111, 1999.

NORAZALINA, S. et al. Anticarcinogenic efficacy of phytic acid extracted from rice bran on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 259-268, 2010.

NELSON, R.L. et al. The effect of iron on experimental colorectal carcinogenesis. **Anticancer Research**, v. 9, p. 1477-1482, 1989.

ONOMI, S. et al. Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats

fed a high-sucrose diet. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, p. 1379-1381, 2004. Disponível: https://www.jstage.jst.go.jp/article/bbb/68/6/68_6_1379/_article. Acesso em: 18 de Agosto de 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.68.1379>.

PACHECO, G.D. et al. Phytic acid protects porcine intestinal epithelial cells from deoxynivalenol (DON) cytotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.64, n.4, p. 345-347, 2012a.

PACHECO, G.D. et al. Utilização do farelo de gérmen de milho desengordurado, como fonte de fitado, associado à fitase em rações de suínos: efeitos sobre a qualidade da carne e da linguiça tipo frescal. **Semina. Ciências Agrárias**, v. 33, p. 819-828, 2012b. Disponível: <http://www.uel.br/portal/frm/frmOpcao.php?opcao=http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/s-emagrarias>. Acesso em: 17 de Novembro de 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n2p819>.

PLAAMI, S. Myoinositol phosphates: analysis, content in foods and effects in nutrition. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 30, p. 633-647, 1997.

PORRES, J.M. et al. Dietary intrinsic phytate protects colon from lipid peroxidation in pigs with a moderately high dietary iron intake. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 221, p. 80-86, 1999.

PRYNNE, C.J. et al. Dietary fibre and phytate; a balancing act. Results from 3 time points in a British Birth Cohort. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 274-280, 2010.

RAFACZ-LIVINGSTON, K.A. et al. Citric acid improves phytate phosphorus utilization in crossbred and commercial broiler chicks. **Poultry Science**, v.84, p. 1370-1375, 1999. Disponível: <http://ps.fass.org/content/84/9/1370.long>. Acesso em: 22 de Novembro de 2013.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006. Disponível:

<http://quimicanova.sbq.org.br/qn/qnol/2006/vol29n4/index.htm>. Acesso em: 23 de Novembro de 2013.

RIZVI, I. et al. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits cellular proliferation in melanoma. **Journal of Surgical Research**, v. 133, p.3-6, 2006.

RODRIGUES, I.; NAEHRER, K. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxin in feedstuffs and feed. **Toxins**, v. 4, p. 663-675, 2012.

SAIED, I.T.; SHAMSUDDIN, A.M. Up-regulation of the tumor suppressor gene p53 and WaF1 gene expression by IP6 in HT-29 human colon carcinoma cell line. **Anticancer Research**, v. 18, p. 1479-84, 1998.

SANDBERG, A-B. et al. Effects of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. **Journal of Food Science**, v. 54, p. 159-161, 1989.

SCHLEMMER, U. et al. Degradation of phytate in the gut of pigs-pathway of gastrointestinal inositol phosphate hydrolysis and enzyme involved. **Archives of Animal Nutrition**, v 55, p. 255-280, 2001.

SCHROTEROVÁ, L. et al. Effect of phytic acid and inositol on the proliferation and apoptosis of cells derived from colorectal carcinoma. **Oncology Reports**, v. 23, p. 787-793, 2010. Disponível: <http://www.spandidos-publications.com/or/23/3/787>. Acesso em: 15 de Agosto de 2013. doi: 10.3892/or_00000699.

SEEDS, A.M. et al. Molecular definition of novel inositol polyphosphate metabolic pathway initiated by inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 27654-27661, 2005.

SELLE, P.H. et al. Phytate and phytase: consequences for protein utilization. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 255-278, 2000.

SELLE, P.H.; RAVINDRAN, V. Microbial phytase in poultry nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 135, p. 1-41, 2007. Disponível: <http://anuragaja.staff.ipb.ac.id/>

files/2012/10/Selle_2007_AFST_Phytase-poultry-rev.pdf. Acesso em: 10 de Novembro de 2013. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.010.

SHAMSUDDIN, A.M.; YANG, G-Y. Inositol hexaphosphate inhibits growth, and induces differentiation of PC-3 human prostate cancer cells. **Carcinogenesis**, v.16, p. 1975-1979, 1995.

SHAMSUDDIN, A.M. Metabolism and cellular functions of IP6: a review. **Anticancer Research**, v. 19, p. 3733-3736, 1999.

SHEARS, S.B. Inositol pentakis-and hexakisphosphate metabolism adds versatility to the actions of inositol polyphosphates: novel effects on ion channels and protein traffic. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 26, p. 187-227, 1996.

SINGH, A. et al. Modulatory influence of aerecoline on the phytic acid-altered hepatic biotransformation system enzymes, sulfhydryl content and lipid peroxidation in a murine system. **Cancer Letters**, v. 117, p. 1-6, 1997.

SINGH, R.P.; AGARWAL, R. Inositol hexaphosphate inhibits growth and induces G1 arrest and apoptotic death of androgen-dependent human prostate carcinoma LNCaP cells. **Neoplasia**, v.6, p. 646-659, 2004a.

SINGH, P.R. et al. In vivo suppression of hormone-refractory prostate cancer growth by inositol hexaphosphate: induction of insulin-like growth factor binding protein-3 and inhibition of vascular endothelial growth factor. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 244-250, 2004b.

SOMASUDDAR, P. et al. Inositol hexaphosphate (IP6): a novel treatment for pancreatic cancer. **Journal of Surgical Research**, v. 126, p. 199-203, 2005.

SUDHEER, K.M. et al. Antiinflammatory and antiulcer activities of phytic acid in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 41, p. 179-185, 2004.

TANTIVEJKUL, K. et al. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer

metastasis, I: in vitro studies of adhesion, migration and invasion of MDA-MB 231 human breast cancer cells. **Anticancer Research**, v. 23, p. 3671-3679, 2003.

VUCENIK, I. et al. Antitumor activity of phytic acid (inositol hexaphosphate) in murine transplanted and metastatic fibrosarcoma, a pilot study. **Cancer Letters**, v. 65, p. 9-13, 1992.

VUCENIK, I. et al. Comparison of pure inositol hexaphosphate (IP6) and high-bran diet in the prevention of DMBA-induced rat mammary carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v 28, p. 7-13, 1997.

VUCENIK, I. et al. IP6 treatment of liver cancer, I: IP6 inhibits growth and reverses transformed phenotype in HepG2 human liver cancer cell line. **Anticancer Research**, v. 18, p. 4083-4090, 1998a.

VUCENIK, I. et al. IP6 in treatment of liver cancer: II: intra-tumoral injection of IP6 regresses pre-existing human liver cancer xenotransplanted in nude mice. **Anticancer Research**, v.18, p. 4091-4096, 1998b.

VUCENIK, I. et al. Novel anticancer function of Inositol hexaphosphate (IP6): inhibition of human rhabdomyosarcoma in vitro and in vivo. **Anticancer Research**, v. 18, p. 1377-1384, 1998c.

VUCENIK, I. et al. Antiplatelet activity of inositol hexaphosphate (IP6). **Anticancer Research**, v. 19, p. 3689-3693, 1999.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A.M. Protection against cancer by dietary IP6 and Inositol. **Nutrition and Cancer**, v. 55, 109-125, 2006.

XU, Q. et al. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. **Toxicology**, v. 245, p. 101-108, 2008.

ZHANG, Z. et al. Inositol hexaphosphate-induced enhancement of natural killer cell activity correlates with suppression of colon carcinogenesis in rats. **World Journal of**

Gastroenterology, v. 11, p. 5044-5046, 2005. Disponível: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v11/i32/5044.htm>. Acesso em: 15 de Agosto de 2013.

ZI, X. et al. Impairment of erbB1 receptor and fluid phase endocytosis and associated mitogenic signalling by inositol hexaphosphate in human prostate carcinoma DU145 cells. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 2225-2235, 2000.

WANG, L. et al. Anti-tumor effect of phytic acid on human osteosarcoma U20S cells in vitro. **Wei Sheng Yan Jiu**, v.41, n.6, p. 943-946, 2012. (Resumo em inglês)

WEGLARZ, L. et al. Anti-proliferative effects of inositol hexaphosphate and verapamil on human colon cancer Caco-2 and HT-29 cells. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 63, p. 443-445, 2006.

WEGLARZ, L. et al. Phytic acids modulates in vitro IL-8 and IL-6 release from colonic epithelial cells stimulate with LPS and IL-1 beta. **Digestive Diseases and Science**, v. 52, p. 93-102, 2007.

YANG, G-Y.; SHAMSUDDIN, A.M. IP6-induced growth inhibition and differentiation of HT-29 human colon cancer cells: involvement of intracellular inositol phosphates. **Anticancer Research**, v.15, p. 1479-2488, 1995.

YORK, J.D. et al. A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. **Science**, v. 285, p. 96-100, 1999.

Tabela 1. Conteúdo de ácido fítico em cereais.

Cereal	Ácido fítico (%/peso)
Gérmen de milho	6,4
Farelo de trigo	4,8
Arroz	2,2
Cevada	1,0
Aveia	0,8

Adaptado de Graf & Eaton, 1990.

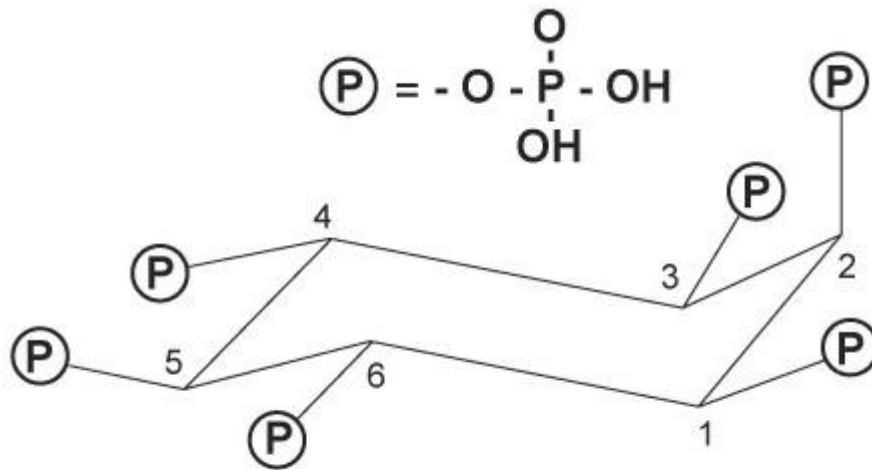


Figura 1. Estrutura do ácido fólico (Fonte: FARIA et al., 2006)

Tabela 2. Ação antineoplásica do IP6 em diferentes modelos experimentais.

Neoplasia	Modelo Experimental	Efeitos do IP6	Referência
Adenocarcinoma pancreático	<i>In vitro</i> : células MIAPaCa e Panc-1	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento tumoral • Indução da apoptose • Inibição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) 	SOMASUNDAR et al., 2005; McMILLAN et al., 2007
Adenocarcinoma de próstata	<i>In vitro</i> : células PC-3, DUI 45 e LNCaP	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento • Indução da diferenciação celular • Aumento da apoptose • Diminuição da proliferação celular 	SHAMSUDDIN & YANG, 1995; SINGH & AGARWAL, 2004
	<i>In vivo</i> : camundongo Água	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da proliferação celular • Inibição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) 	SINGH et al., 2004
Carcinoma cervical	<i>In vitro</i> : células HeLa cells	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento tumoral • Indução do apoptose 	FERRY et al., 2002
Carcinoma de cólon	<i>In vitro</i> : células HT-29	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da proliferação celular • Indução da apoptose • Indução da diferenciação celular 	YANG, SHAMSUDDIN, 1995; SCHROTEROVÁ et al., 2010
	<i>In vivo</i> : camundongo, rato (Dieta/Água)	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da proliferação celular • Inibição da formação das criptas aberrantes • Inibição da formação tumoral • Aumento da atividade das células “natural killer” 	CHALLA et al., 1997; ZHANG et al., 2005; NORAZALINA et al., 2010
Carcinoma hepático	<i>In vitro</i> : células Hep G2	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento tumoral 	VUCENIK et al., 1998a
	<i>In vivo</i> : camundongo, rato (Dieta/água)	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da carcinogênese • Regressão tumoral • Inibição do crescimento tumoral 	VUCENIK et al., 1998b; LEE et al., 2005
Carcinoma mamário	<i>In vitro</i> : células MCF-7 e MDA-MB 231	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da transformação tumoral • Inibição da adesão, migração e invasão tumoral 	EL-SHARBINY et al., 2001; TANTIVEJKUL et al., 2003.
	<i>In vivo</i> : camundongo, rato <ul style="list-style-type: none"> • Dieta/Água 	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da incidência, tamanho e multiplicidade tumoral • Inibição da carcinogênese 	HIROSE et al., 1994; VUCENIK et al., 1997

Tabela 3. Ação antineoplásica do IP6 em diferentes modelos experimentais (continuação).

Neoplasia	Modelo experimental	Efeitos do IP6	Referência
Carcinoma de pele	<i>In vitro</i> : células JB6, HEL-30	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da transformação tumoral • Diminuição da proliferação celular 	HUANG et al., 1997; NICKEL & BELURY, 1999
	<i>In vivo</i> : camundongo Tópico	<ul style="list-style-type: none"> • Prevenção da carcinogênese 	GUPTA et al., 2003
Fibrossarcoma	<i>In vivo</i> : camundongo, rato Dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição da incidência tumoral, crescimento e metástase pulmonar 	VUCENIK et al., 1992
Glioblastoma maligno	<i>In vitro</i> : células T98	<ul style="list-style-type: none"> • Indução da apoptose 	KARMAKAR et al., 2007
Leucemia	<i>In vitro</i> : células K562	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da proliferação celular 	DELILIERS et al., 2002;
		<ul style="list-style-type: none"> • Indução da diferenciação celular 	BOZSIK et al., 2007
		<ul style="list-style-type: none"> • Indução da apoptose 	
Melanoma	<i>In vitro</i> : células HTB 68	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento tumoral 	RIZVI et al., 2006
		<ul style="list-style-type: none"> • Indução da apoptose 	
Osteossarcoma	<i>In vitro</i> : células U20S	<ul style="list-style-type: none"> • Indução da apoptose 	WANG et al., 2012
Rabdomiossarcoma	<i>In vitro</i> : células RD	<ul style="list-style-type: none"> • Inibição do crescimento tumoral 	VUCENIK et al., 1998c
		<ul style="list-style-type: none"> • Indução da diferenciação celular 	

Tabela 4. Ação do ácido fítico em diversas condições patológicas.

Condição patológica	Modelo experimental	Efeito do IP6	Referência
Cálculo renal	<i>In vivo</i> : rato Dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Diminui a calcificação nas papilas renais 	GRASES et al., 1998
	Clínico: humanos Estudo prospectivo de dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Diminui o risco de formação de cálculo renal 	CURHAN et al., 2004
Calcificação de tecidos moles (IRC)	<i>In vivo</i> : rato Dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Redução da formação de cristais de hidroxiapatita 	GRASES et al., 2008
Colesterol	<i>In vivo</i> : rato Dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição do triglicerídeo sérico 	ONOMI et al., 2004
Diabetes	<i>In vitro</i> : células HITT15	<ul style="list-style-type: none"> • Estimula a secreção da insulina • Regulação dos canais de Ca² 	EFANOV et al., 1997
	<i>In vivo</i> : camundongo, rato Dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Regulação da secreção de insulina • Diminuição da hiperglicemia 	KIM et al., 2010
Doença cardiovascular	<i>In vivo</i> : rato Dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da calcificação arterial e cardíaca 	GRASES et al., 2006
Doença de Alzheimer	<i>In vitro</i> : células MC65	<ul style="list-style-type: none"> • Proteção contra a citotoxicidade causada pelo precursor do amiloide β 	ANEKONDA et al., 2011
	<i>In vivo</i> : camundongo Água	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da peroxidação lipídica 	ANEKONDA et al., 2011
Doença de Parkinson	<i>In vitro</i> : células mesencefálicas/dopaminérgicas de ratos	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da apoptose • Aumento da viabilidade celular 	XU et al., 2008
Inflamação e fibrose pulmonar	<i>In vivo</i> : rato Instilação traqueal	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da inflamação • Redução da fibrose 	KAMP et al., 1995
Inflamação intestinal (cólon)	<i>In vitro</i> : células Caco-2	<ul style="list-style-type: none"> • Modulação da secreção de IL-8 e IL-6 	WEGLARZ et al., 2006
Trombose/Arteriosclerose	<i>In vitro</i> : sangue humano	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da agregação plaquetária 	VUCENIK et al., 1999
Úlcera gástrica	<i>In vivo</i> : rato Dieta	<ul style="list-style-type: none"> • Diminuição da erosão, necrose, congestão e hemorragia 	SUDHEER et al., 2004

MICOTOXINAS

Introdução

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidos por fungos. As contaminações ocorrem mundialmente, principalmente pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, predominando em climas tropicais e subtropicais, nos quais o desenvolvimento fúngico é favorecido pelas condições ambientais (DILKIN et al., 2000; MALLMANN; DILKIN, 2007). São contaminantes de cereais, grãos, frutas, forragens e produtos manufaturados, sendo que a fumonisina B1 (FB1) e o desoxinivalenol (DON) são micotoxinas frequentemente encontradas no milho e trigo, cereais que compõem a alimentação humana e ração animal (TARANU et al., 2008; ETIENNE; WACHÉ, 2008).

Diversos estudos relatam os efeitos tóxicos tanto em humanos (MARESCA et al., 2002; LAZO; SIERRA, 2008) como em animais (DIEKMAN; GREEN, 1992; HASCHECK et al., 2001; RAYMOND et al., 2003; CHOWDHURY; SMITH, 2004; BRACARENSE et al., 2012), sendo a espécie suína uma das mais sensíveis à intoxicações por fumonisina e desoxinivalenol (MALLMANN; DILKIN, 2007; YAZAR; OMURTAG, 2008).

Fumonisina B1(FB1)

As fumonisinas são produzidas principalmente pelos fungos do gênero *Fusarium*. Cerca de 20 fumonisinas são conhecidas, mas somente as fumonisinas B1, B2 e B3 têm importância toxicológica, sendo a FB1 a mais tóxica (MALLMANN; DILKIN, 2007; TARANU et al., 2008).

A FB1 é mundialmente encontrada em grãos, principalmente no milho. A toxina é estável ao calor e só é reduzida significativamente durante processos nos quais a temperatura excede os 150°C. Ocorre pouca degradação da FB1 durante a fermentação ou manufatura por trituração úmida do amido de milho, já que esta é solúvel em água. Portanto, é comum a sua

ocorrência em produtos derivados de milho (KAWASHIMA; SOARES, 2006; CALDAS; SILVA, 2007). No Brasil, a percentagem de contaminação do milho por FB1 varia dependendo da região e condições climáticas, podendo chegar a 100% (ONO et al., 1999; ORSI, 2000; KAWASHIMA; SOARES, 2006; CALDAS; SILVA, 2007)

Em humanos, o nível de ingestão tolerável de FB1 é de 2µg/kg de peso/dia (STOCMANN et al., 2008). Não estão bem estabelecidos níveis máximos toleráveis de FB1 para os animais, mas o Comitê de Micotoxinas da Associação Americana de Diagnóstico Laboratorial Veterinário tem recomendado níveis máximos de 5, 10, 50 e 50 µg/g de ração para equinos, suínos, bovinos e aves respectivamente (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) determinou por meio da Resolução RDC nº7 (18 de Fevereiro de 2011) que a partir de janeiro de 2014 o limite máximo tolerável de FB1 em milho em grão para posterior processamento é 5000 µg/Kg (ANVISA, 2011).

A ingestão da FB1 por mulheres grávidas desencadeia defeitos no fechamento do tubo neural dos fetos (MISSMER et al., 2006) e há evidências de que FB1 está relacionada ao desenvolvimento de câncer no esôfago (YOSHIZAWA et al., 1994; STOCKMANN et al., 2008). A intoxicação por FB1 nos animais causa leucoencefalomalácia em equinos e nefrotoxicidade em ovinos (MALLMANN et al., 1990; VOSS et al., 2001), deficiência imunológica e lesões no fígado e nos rins em galinhas (BIANCHI et al., 2005), hepatotoxicidade e nefrotoxicidade em bovinos (MATHUR et al., 2001) e câncer hepático e renal em roedores (SCOTT, 1993).

Metabolismo e Modo de Ação

A absorção da FB1 é baixa no intestino, sendo rapidamente excretada em sua maior parte pela bile. A FB1 absorvida é retida em diferentes órgãos, principalmente em pulmões, rins, fígado, coração e pâncreas (HASCHECK et al., 2001; DILKIN et al., 2003).

O metabolismo da FB1 ocorre em dois estágios: no primeiro, a monoaminoxidase remove o grupo amina e no segundo, as cadeias de ácido tricarboxílico propano são removidas por esterases. Sob ação das esterases ocorre a hidrolização da FB1 que é transformada em um análogo da ceramida, dez vezes mais tóxico que a FB1 intacta (DESAI et al., 2002). Esse análogo da ceramida inibe a ação da ceramida sintase, responsável pela biossíntese dos esfingolipídios (SCOTT, 1993; SEGVIC; PEPELJNJAK, 2001).

Os esfingolipídios são componentes das membranas celulares e tem importante papel na regulação do crescimento, diferenciação, morfologia e permeabilidade celular. Essa inibição faz com que os intermediários dos esfingolipídios, a esfinganina (Sa) e a esfingosina (So) se acumulem na circulação sanguínea. A interrupção da biossíntese dos esfingolipídios leva a alterações de crescimento e diferenciação celular, apoptose, peroxidação lipídica e pode ser um fator carcinogênico (DESAI et al., 2002; SORIANO et al., 2005).

Intoxicação Aguda em Suínos

Suínos intoxicados com altas doses de FB1 (acima de 100mg/kg/ração) apresentam sinais clínicos de intoxicação aguda geralmente de três a cinco dias após o início de ingestão da ração contaminada (HASCHECK et al., 2001). O quadro clínico caracteriza-se por edema pulmonar, hepatotoxicidade, cardiotoxicidade e lesões pancreáticas (MALLMANN; DILKIN, 2007). Além disso, os suínos apresentam dispneia, fraqueza, anorexia, letargia, vômito, diarreia, icterícia e cianose, mais evidentes nas orelhas, focinho, esclera e membranas mucosas. Nas fêmeas gestantes pode ocorrer aborto de um a quatro dias após início dos sinais ou edema pulmonar nos leitões após o nascimento. Dependendo da gravidade da intoxicação os animais podem morrer em poucas horas ou até dez dias após a primeira ingestão da micotoxina (POZZI et al., 2002; MALLMANN; DILKIN, 2007).

Intoxicação Crônica em Suínos

A intoxicação crônica de suínos por FB1 ocorre pelo consumo de ração com baixas concentrações da toxina e por um tempo prolongado. Suínos alimentados com ração contaminada na concentração de 6 mg de fumonisina/kg durante 5 semanas apresentaram edema pulmonar e lesões hepáticas como vacuolização e megalocitose (GRENIER et al., 2011).

Os principais sinais clínicos são inespecíficos e podem ser confundidos com desnutrição, deficiência genética, manejo inadequado e outras afecções (MALLMANN; DILKIN, 2007). Os animais apresentam letargia, perda de apetite, aumento das frequências cardíacas e respiratórias, cianose na esclera, membranas e pelos eriçados (DILKIN et al., 2004). A FB1 em intoxicações crônicas altera a resposta humoral e diminui a resposta de anticorpos vacinais em suínos, inibe a fagocitose macrofágica pulmonar, levando ao acúmulo de material membranoso nas células endoteliais dos capilares pulmonares, e induz a apoptose e necrose nos tecidos linfoides (POZZI et al., 2002; PIVA et al., 2005; TARANU et al., 2005).

Ação Gastrointestinal

Apesar da FB1 ser pouco absorvida, as células do epitélio intestinal são expostas a uma concentração elevada da toxina e a circulação entero-hepática provavelmente aumenta ainda mais essa exposição (BOUHET et al., 2004). Estudos *in vitro* demonstraram que a FB1 inibe o ciclo celular em G0/G1, levando a uma diminuição da proliferação celular intestinal (BOUHET et al., 2004; GARCIA et al., 2007) e induz a apoptose celular (DRAGAN et al., 2001). Os mecanismos pelos quais a FB1 induz à apoptose não estão totalmente esclarecidos, mas provavelmente envolvem a inibição da proteína quinase C, ativação da caspase-3 e das MAPKs (JONES et al., 2001; DESAI et al., 2002).

A resistência elétrica transepitelial e a expressão da E-caderina também são alteradas

pela FB1, levando a rupturas no epitélio celular intestinal permitindo a translocação bacteriana (BOUHET et al., 2004; BRACARENSE et al., 2012). A FB1 reduz a expressão de citocinas como IL-8, diminuindo o número de neutrófilos durante uma infecção, contribuindo para uma maior susceptibilidade a doenças infecciosas (OSWALD et al., 2006; BOUHET et al., 2006). Além disso, aumenta a expressão do TNF- α e da ciclo-oxigenase-2 (MELI et al., 2000).

A absorção dos nutrientes é prejudicada na intoxicação por FB1, principalmente devido a alterações na altura das vilosidades e profundidade das criptas, e a atrofia e fusão das vilosidades intestinais (DILKIN et al., 2004; PIVA et al., 2005; BRACARENSE et al., 2012).

Desoxinivalenol (DON)

Os tricotecenos são metabólitos tóxicos e quimicamente semelhantes, produzidos por diversos fungos dos gêneros *Fusarium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Stachybotrys* e *Trichoderma*. Subdividem-se em macrocíclicos e não macrocíclicos (tipos A e B). O desoxinivalenol (DON), também conhecido como vomitoxina, pertence ao grupo não macrocíclico tipo B e é um dos tricotecenos de maior ocorrência mundial (NORDBY et al., 2004; MALLMANN; DILKIN, 2007).

O DON ocorre em diversos cereais e produtos, principalmente quando cultivados no inverno, em que baixas temperaturas e alta umidade favorecem o desenvolvimento fúngico, destacando-se a contaminação do trigo, milho, cevada e aveia (MALLMANN; DILKIN, 2007; PERKOWSKI et al., 2008; YAZAR; OMURTAG, 2008). Calori-Domingues et al. (2007) constataram que 94% do trigo nacional e 88% do importado estavam contaminados por DON e a maior concentração da toxina estava presente nos grãos provenientes do Estado do Paraná.

A toxina é estável ao calor e não é degradada nos processos de moagem e autoclavagem. A hidrólise no estômago após ingestão não ocorre devido a sua resistência ao pH ácido (YAZAR; OMURTAG, 2008). Estudos mostraram a presença da toxina em produtos derivados de trigo, milho e aveia, utilizados na alimentação humana e animal (CAVRET; LECOEUR, 2006; TURNER et al., 2008).

Segundo a Comissão Científica Europeia do Comitê para Alimentos o nível máximo de ingestão diária para humanos adultos, principalmente crianças, é de 1000 ng/kg de peso corporal (SCF 2002). Um nível menor que 0,4mg de tricotecenos/kg de ração é descrito como aceitável para suínos (MALLMANN; DILKIN, 2007). No Brasil a ANVISA determinou por meio da Resolução RDC nº 7 (18 de Fevereiro de 2011) que partir de Janeiro de 2014 o limite máximo tolerável de DON é de 3000 µg/kg para trigo e milho em grãos; 1500 µg/kg para farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz; 1250 µg/kg para farinha de trigo não-integral, massas, crackers, biscoitos de água e sal e produtos de panificação (ANVISA, 2011).

Em humanos, o DON causa diarreia, vômito e perda de peso (LUO et al., 1990; MARESCA et al., 2002). Nos animais, pode causar imunossupressão, vômito, anorexia, gastroenterite, diarreia, perda de peso e queda na eficiência alimentar (FAIXOVA et al., 2007; PESTKA et al., 2008; TURNER et al., 2008).

Metabolismo e Modo de Ação

O DON é rapidamente absorvido no intestino delgado após ingestão e ao contrário da FB1 não se acumula nos tecidos, sendo excretado principalmente por meio da urina (TURNER et al., 2008; WACHE et al., 2009). O metabolismo do DON ocorre pela redução do grupo epóxi e glucuronidação no fígado. Após o metabolismo a toxina inibe enzimas responsáveis pelo alongamento e terminação da cadeia polipeptídica, bloqueando a peptidiltransferase que pertence à subunidade 60S, impedindo a translação de bases, causando

estresse ribotóxico (TURNER et al., 2008; YAZAR; OMURTAG, 2008). Portanto, inibe a síntese de DNA, RNA, a função mitocondrial, interfere na proliferação e apoptose celular, causa lesões na membrana celular e aumenta a peroxidação lipídica (YAZAR; OMURTAG, 2008).

As células mais afetadas pela inibição da síntese protéica são as de rápida proliferação, como as do epitélio intestinal, pele, mucosas, células linfóides e eritrócitos, sendo também afetados fígado, rins e pâncreas. O efeito sobre eritrócitos está associado a hemorragias tanto em humanos quanto em animais. O tempo de protrombina é aumentado, porém o fator primário da hemorragia é a diminuição do fator VII da cascata de coagulação (MALLMANN; DILKIN, 2007).

O DON altera a atividade da serotonina no sistema nervoso central levando a uma diminuição do apetite e causa a nefropatia por IgA em ratos, o mais comum tipo de glomerulonefrite em humanos, cuja etiologia é desconhecida (FAIXOVA et al., 2007; TURNER et al., 2008; YAZAR; OMURTAG, 2008).

Intoxicação Aguda em Suínos

Os suínos com intoxicação aguda por DON apresentam vômito, diarreia, anorexia, tremores musculares, ranger de dentes, hemorragias gastrointestinais e cutâneas (MALLMANN; DILKIN, 2007; ETIENNE; WACHE, 2008). Suínos alimentados com 5 mg/DON/kg ração durante cinco dias apresentaram diminuição do consumo de ração, queda na eficiência alimentar e perda de peso (HE et al., 1993). Young et al. (1983) constataram que suínos alimentados durante três dias com uma concentração de 20 mg/DON/ kg ração tiveram vômito e perda do apetite.

Estudos mostraram que a intoxicação aguda por DON causa imunossupressão,

diminuiu a produção de imunoglobulinas e anticorpos séricos, e leva a apoptose de tecidos linfoides (ETIENNE; WACHE, 2008; PESTKA et al., 2008).

Intoxicação Crônica em Suínos

Os sinais clínicos de suínos intoxicados cronicamente por DON não são específicos e caracterizam-se principalmente por diminuição do consumo de ração, depressão e perda de peso (SWAMY et al., 2002; MALLMANN; DILKIN, 2007). Suínos alimentados com 1 a 2 mg/DON/kg ração tiveram perda de peso (ETIENNE et al., 2008) e com 3 mg/DON/kg ração apresentaram lesões hepáticas e renais (GRENIER et al., 2011).

Intoxicações crônicas levam a alterações imunológicas como diminuição da produção de imunoglobulinas e anticorpos séricos, levando a um aumento da susceptibilidade a diversos patógenos, porém a ingestão de concentrações inferiores a 1000µg DON/kg de ração não causaram alterações hematológicas, bioquímicas e imunológicas nos suínos (ACCENSI et al., 2006; MALLMANN; DILKIN, 2007).

Na intoxicação crônica por DON, a ingestão de ração não diminuiu linearmente, o que sugeriu que os suínos desenvolveram tolerância à toxina (COTE et al., 1985). Outras lesões são observadas como congestão vascular das mucosas estomacal e intestinal, erosões e degenerações multifocais no estômago, depleção linfóide nos linfonodos, degeneração e necrose das placas de Peyer e presença de infiltrado inflamatório na lâmina própria intestinal (COTE et al., 1985; PESTKA et al., 2008). Estudos mostram que o DON leva a falhas reprodutivas nos suínos por reduzir a fertilidade, inibindo a maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário (MALEKINEJAD et al., 2007; AMATA et al., 2009).

Ação Gastrointestinal

O DON inibe a síntese proteica principalmente nas células de rápida proliferação,

tornando o intestino um dos principais alvos (MALLMANN; DILKIN, 2007). A intoxicação aguda leva ao desenvolvimento de gastroenterite hemorrágica (PESTKA et al., 2008). A toxina tem efeito seletivo em sua ação no intestino, em baixas concentrações inibe a absorção de D-glicose e D-galactose e em altas concentrações altera o transporte de outros nutrientes (MARESCA et al., 2002). O DON afeta principalmente o duodeno e jejuno alterando a morfologia das vilosidades e criptas, diminuindo a conversão alimentar, a absorção de nutrientes e aumentando a susceptibilidade a doenças (AWAD et al., 2007; BRACARENSE et al., 2012).

Nas intoxicações crônicas, altera a resistência elétrica transepitelial, diminui a expressão da E-caderina, da claudina e da ocludina, aumentando a permeabilidade intercelular, tornando o órgão susceptível à infecções (AWAD et al., 2005; PINTON et al., 2010; BRACARENSE et al., 2012). O DON ativa as MAPKs ERK, JNK e p38, induzindo a proliferação celular, apoptose e aumento da expressão da ciclo-oxigenase-2 (PESTKA, 2008). No entanto, pode ativar as MAPKs em níveis insuficientes para induzir a apoptose, mas suficientes para promover a transcrição de fatores que estimulam a produção das citocinas e interleucinas pró-inflamatórias (CHEN et al., 1998).

O DON desregula a produção de imunoglobulinas, principalmente IgA, além de promover uma depleção e necrose de células linfoides das placas de Peyer e necrose dos linfonodos mesentéricos (COOPOCK et al., 1985; BOUHET; OSWALD, 2005; PESTKA et al., 2008).

Suíno como modelo experimental e a técnica de explantes

O suíno e o ser humano apresentam similaridades fisiológicas e morfológicas no trato gastrointestinal (GUILLOTEAU et al., 2010). Tal similaridade faz com que o suíno seja um excelente modelo experimental para estudo de doenças, agentes biológicos, ação de

substâncias carcinogênicas e tóxicas como as micotoxinas.

A técnica de explantes também denominada de método *ex vivo*, caracteriza-se pelo cultivo de fragmentos de órgãos colhidos com *punch* de biópsia ou bisturi, incubados em placas com meio de cultura em temperatura semelhante à corpórea, mimetizando as condições do organismo vivo (BANSAL et al., 2009; RANDALL et al., 2011). Além disso, a utilização da técnica de explantes busca otimizar e minimizar o uso de animais nos experimentos, além disso, preserva a morfologia tecidual com todas as suas estruturas como no *in vivo* (RANDALL et al., 2011).

REFERÊNCIAS

ACCENSI, F.; PINTON, P.; CALLU, P.; BOURGES, N. A.; GUELFY, J. F.; GROSJEAN, F.; OSWALD, I. P. Ingestion of low doses of deoxynivalenol does not affect hematological biochemical, or immune responses of piglets. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 1935-1942, 2006.

AMATA, I.A.; ADEJUMO, D.O.; BRATTE, L. Contamination of swine diets by feed borne *Fusarium* mycotoxins and its effect on metabolism and reproduction in first parity gilts: use of mycotoxin in blinders. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, p. 332-335, 2009.

ANVISA. Resolução RCD nº 7 (18 de Fevereiro de 2011). Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home>. Acessado em: 05 de Janeiro de 2014.

AWAD, W. A.; BOHM, J.; RAZZAZI-FAZELI, E.; ZENTEK, J. *In vitro* effects of deoxynivalenol on electrical properties of intestinal mucosa of laying hens. **Poultry Science**, v.84, p. 921-927, 2005.

AWAD, W. A.; ASCHENBACH, J.R.; SETYABUDY, F.M.C.S.; RAZZAZI-FAZELI, E.; BOHM, J.; ZENTER, J. *In vitro* effects of deoxynivalenol on small intestinal D-glucose uptake and absorption of deoxynivalenol across isolated jejuna epithelium of laying lens. **Poultry Science**, v. 86, p. 15-20, 2007.

BANSAL, D.; AVE, P.; KERNEIS, S.; FRILEUX, P.; BOCHE, O.; BAGLIN, A.C.; DUBOST, G.; LEGUERN, A.S.; PREVOST, M.C.; BRACH, R.; MIRELAN, D.; GUILLE, N.N.; LABRUYE, R.E. An *ex-vivo* human intestinal model to study *Entamoeba histolytica* pathogenesis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.3, p. 1-11, 2009.

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.

BRACARENSE, A-P.F.L., LUCIOLI, J., GRENIER, B., PACHECO, G.D., MOLL, W-D., SCHATZMAYR, G., OSWALD, I. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, v. 107, p. 1776-1786, 2012.

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

BOUHET, S.; DORZE, E. L.; PERES, S.; FAIRBROTHER, J. M.; OSWALD, I. P. Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: *in vivo* and *in vitro* studies. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1768-1773, 2006.

BOUHET, S.; OSWALD, I. P. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the

intestinal epithelial cell-derived innate immune response. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 108, p. 199-209, 2005.

CALDAS, E.D.; SILVA, A.C.S. Mycotoxins in corn-based food products consumed in Brazil: an exposure assessment for fumonisins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7974-7980, 2007.

CALORI-DOMINGUES, M.A.; ALMEIDA, R.R.; TOMIWAKA, M.M.; GALLO, C.R.; GLORIA, E.M.; DIAS, C.T.S. Ocorrência de desoxinivalenol em trigo nacional e importado utilizado no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, p. 181-185, 2007

CAVRET, S.; LECOUCER, S. Fusariotoxin transfer in animal. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p. 444-453, 2006.

CHEN, C.Y.; DEL GATTO-KONCZAK, F.; WU, Z.; KACIN, M. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the C-Jun NHZ-terminal kinase. **Science**, v. 280, p. 1945-1949, 1998.

CHOWDHURY, S.R.; SMITH, T. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. **Poultry Science**, v.83, p. 1849-1856, 2004.

COOPOCK, R. W.; SWANSON, S. P.; GELBERG, H. B.; KORETZ, G. D.; HOFFMAN, W. E.; BUCK, W. B.; VESONDER, R. F. Preliminary study of pharmacokinetics and toxicopathy of deoxynivalenol (vomitoxin) in swine. **American Journal of Veterinary Research**, v.46, p. 169-174, 1985.

COTE, L.M.; BEASLEY, V.R.; BRATICH, P.M.; SWANSON, S.P.; SHIVAPRASAD, H.L.; BUCK, W.B. Six-related reduced weight gains in growing swine fed diets containing deoxynivalenol. **Journal of Animal Science**, v. 60, n.1, p. 942-945, 1985.

DESAI, K.; SULLARD, M.C.; ALLEGOOD, J.; WANG, E.; SCHMELZ, E.M.; HARTL, M.; HUMPF, H.U.; LIOTTA, D.C.; PENG, Q.; MERRILL JR., A.H. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1538, p. 188-192, 2002.

DIEKMAN, M.A.; GREEN, M.L. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 1615-1627, 1992.

DILKIN, P.; HASSEGAWA, R.; REIS, T.A.; MALLMANN, C.A.; CORREA, B. Intoxicação experimental de suínos por fumonisinas. **Ciência Rural**, v.34, p. 175-181, 2004.

DILKIN, P.; ZORZETE, P.; MALLMANN, C.A.; GOMES, J.D.F.; UTIYAMA, C.E.; OETTING, L.L.; CORREA, B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1 containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p. 1345-1353, 2003.

DILKIN, P.; MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; HICKMANN, J.L. Classificação macroscópica, identificação da microbiota fúngica e produção de aflatoxinas em híbridos. **Ciência Rural**, v.30, p. 137-141, 2000.

DRAGAN, Y.P.; BIDLACK, W.R.; COHEN, S.M.; GOLDSWORTHY, T.L.; HARD, G.C.; HOWARD, P.C.; RILEY, R.; VOSS, K.A. **Toxicological Science**, v.61, p. 6-17, 2001.

ETIENNE, M.; WACHÉ, Y. Biological and physiological effects of deoxynivalenol (DON) in the pig. In: OSWALD, I. P.; TARANU, I. (Ed.). **Mycotoxins in Farm Animals**. p.113-130, 2008.

FAIXOVA, Z.; FAIX, S.; BORUTOVA, R.; LENG, L. Effect of different doses of deoxynivalenol on metabolism in broiler chickens. **Bull Veterinary Institute Pulawy**, v.51, p. 421-424, 2007.

GARCIA, J.C.R.; RAMOS, C.M.; PINTON, P.; ELVIRA, S.M.; OSWALD, J.P. Evaluación de la citotoxicidad de la aflatoxina y la fumonisina em células intestinales de porcino. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.24, p. 136-141, 2007.

GRENIER, B.; BRACARENSE, A.P.L.; LUCIOLI, J.; PACHECO, G.D.; COSSALTER, A.M.; MOLL, W.D.; SCHATZMAYR, G.; OSWALD, I.P. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 55, p. 761-771, 2011.

GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H.M.; METGES, C.C. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 4-22, 2010.

HASCHEK, W.M.; GUMPRECHT, L.A.; SMITH, G.; TUMBLESON, M.E.; CONSTABLE, P.D. Fumonisin toxicosis in swine: an overview of porcine pulmonary edema and current perspectives. **Environmental Health Perspectives**, v. 19, suppl. 2, p. 251-257, 2001.

HE, P.; YOUNG, L.G.; FORSBERG, C. Microbially detoxified vomitoxin-contaminated corn for young pigs. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 963-967, 1993.

JONES, C.; CIACCI-ZANELLA, J.R.; ZHANG, Y.; HENDERSON, G.; DICKMAN, M. Analysis of fumonisin B1-induced apoptosis. **Environmental Health Perspectives**, v. 109 (Supp2), p. 315-320, 2001.

KAWASHIMA, L.M.; SOARES, L.M.V. Incidência de fumonisina b1, aflatoxina B1, B2, G1 e G2, ocratoxina A e zearalenona em produtos de milho. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 516-521, 2006.

LAZO, R.F.; SIERRA, G. Investigación del efecto de las micotoxinas en el ser humano. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.25, p. 7-11, 2008.

LUO, Y.; YOSHIZAWA, T.; KATAYAMA, T. Comparative study on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins (trichothecenes and zearalenone) in corn and wheat from high- and low-risks areas for human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p. 3723-3726, 1990.

MALEKINEJAD, H.; SCHOEVERS, E.J.; DAEMEN, I.J.J.M.; ZIJLSTRA, C.; COLENBRANDER, B.; FINK-GREMMELS, J.; ROELEN, B.A.J. Exposure of oocytes to the *Fusarium* toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. **Biology of reproduction**, v. 77, p. 840-847, 2007

MALLMANN, C.A.; SANTURIO, J.M.; DILKIN, P. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of corn contaminated with fumonisin B1. **Revista de Microbiologia**,

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P. Micotoxicoses. IN: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Ed). **Doenças dos Suínos**. Goiânia: Câne editorial, p. 487- 509, 2007.

MARESCA, M.; MAHFOUD, R.; GARMY, N.; FANTINI, J. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. **The Journal of Nutrition**, v. 132, p. 2721-2731, 2002.

MATHUR, S.; CONSTABLE, P. D.; EPPLEY, R. M.; WAGGONER, A. L.; TUMBLESON, M. E.; HASCHER, W. M. Fumonisin B1 is hepatotoxic and nephrotoxic in milk-fed calves. **Toxicology Science**, v.60, p. 385-396, 2001.

MISSMER, S.A.; SUAREZ, L.; FELKNER, M.; WANG, E.; MERRIL JR., A.H.; ROTHMAN, J.; HENDRICKS, K.A. Exposure to fumonisinas and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico Border. **Environmental Health Perspectives**, v.14, p. 237-241, 2006.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Diseases**, v.81, p. 556-559, 1997.

ONO, E.Y.S.; SUGIURA, Y.; HOMECHINI, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**, v.147, p. 139-148, 1999.

ORSI, R.B.; POSSI, C.R.; SCHAMMASS, E.A.; NOGUEIRA, J.R.; DIAS, S.M.C.; MALOZZI, M.A.B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, v. 36, p. 75-87, 2000.

OSWALD, I.P. Role of intestinal epithelial cells in the immune defense of the pig intestine. **Veterinary Research**, v.37, p. 359- 368, 2006.

PERKOVISKI, J.; BAIENSKI, T.; WIWART, M.; KOSTECKI, M.; BUSO, M. The effect of environmental conditions on ergosterol and trichothecene content of naturally contaminated oat grain. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, n. 15, p. 271-276, 2008.

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

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

PIVA, A.; CASADEI, G.; PAGLIUCA, G.; CABASSI, E.; GALVANO, F.; SOLFRIZZO, M.; RILEY, R.T.; DIAZ, D.E. Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing fumonisin B1 when fed to weaning piglets. **Journal of Animal Science**, v.83, p. 1939-1943, 2005.

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

RANDALL, K.J.; TURTON, J.; KOSTER, J.R. Explant culture of gastrointestinal tissue- a review of methods and applications. **Cell Biology**, v. 27, p. 267-284, 2011.

RAYMOND, S.L.; SMITH, T.K.; SWAMY, H.V.L.N. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on feed intake, serum chemistry, and hematology of horses, and efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2123-2130, 2003.

SCF (Scientific Committee on Food) 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food and *Fusarium* toxins. Part 6: group evaluation of T-2 toxin, HI-2 toxin, nivaleno and deoxynivaleno: SCF/CS/CNTM/MYC/27. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/fs/sc/scf/out123_en.pdf (acessado em 10 de maio de 2012).

SCOTT, P.M. Fumonisins. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, p. 257-270, 1993.

SEGVIC, M.; PEPELJNJAK, S. Fumonisins and their effects on animal health- a brief review. **Veterinarski Arhiv**, v.71, p. 299- 323, 2001.

SORIANO, J.M.; GONZALEZ, L.; CATALA, A.I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. **Progress in Lipid Research**, v.44, p. 345-356, 2005.

STOCKMANN-JUVALA, H.; SAVOLAINEN, K. A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. **Human & Experimental Toxicology**, v. 27, p. 799-809, 2008.

SWAMY, H.V.L.N.; SMITH, T.K.; MacDONALD, E.J.; BOERMANS, H.J.; SQUIRES, E.J. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on swine performance, brain regional neurochemistry, and serum chemistry and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3257-3276, 2002.

TARANU, I.; MARIN, D.E.; BOUHET, S.; PASCALE, F.; BAILLY, J.D.; MILLER, J.D.; PINTON, P.; OSWALD, J.P. Mycotoxin Fumonisin B1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. **Toxicological Sciences**, v. 84, p. 301-307, 2005.

TARANU, I.; MARIN, D.E.; OSWALD, J.P. Effect of fumonisin on the pig. In: OSWALD, J.P.; TARANU, I (Ed.). **Mycotoxins in farm animals**, p.91-111, 2008.

TURNER, P.C.; ROTHWELL, J.A.; WHITE, K.L.M.; GONG, Y.Y.; CADE, J.E.; WILD,

C.P. Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. **Environmental Health Perspectives**, v.16, p. 21-25, 2008.

VOSS, K.A.; RILEY, R.T.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; FILMORE, I.M.; HOWARD, P.C.; PLATTNER, R.D.; COLLINS, T.F.X.; HANSEN, D.K.; PORTER, J.K. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, suppl. 2, p. 259-266, 2001.

WACHE, Y.J.; VALAT, C.; POSTOLLEC, G.; BOUGEARD, S.; BUREL, C.; OSWALD, I.P.; FRAVALO, P. Impact of deoxynivalenol on the intestinal microflora of pigs. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p. 1-17, 2009.

YAZAR, S.; OMURTAG, G.Z. Fumonisins, trichothecenes and zearalenone in cereals. **International Journal of Molecular Sciences**, v.9, p. 2062-2090, 2008.

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

YOSHIZAWA, T.; YAMASHITA, A.; LUO, Y. Fumonisin occurrence in corn from high and low risk areas from human esophageal cancer in China. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 1626-1629, 1994.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos do ácido fítico em explantes jejunais de suínos expostos ao desoxinivalenol e fumonisina B1.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o efeito do ácido fítico em diferentes doses sobre a morfologia intestinal, proliferação celular, apoptose e expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2) em explantes jejunais de suínos.
- Caracterizar os efeitos do ácido fítico sobre a morfologia histológica, proliferação celular, apoptose, expressão de E-caderina e ciclo-oxigenase-2 em explantes jejunais de suínos expostos ao desoxinivalenol e fumonisin B1.

4 ARTIGO 1

EFFECT OF PHYTIC ACID FROM RICE AND CORN ON MORPHOLOGY, CELL PROLIFERATION, APOPTOSIS AND CYCLOOXYGENASE-2 EXPRESSION IN SWINE JEJUNAL EXPLANTS[#]

EFEITO DO ÁCIDO FÍTICO DE ARROZ E MILHO SOBRE A MORFOLOGIA, PROLIFERAÇÃO CELULAR, APOPTOSE E EXPRESSÃO DA CICLO-OXIGENASE-2 EM EXPLANTES JEJUNAIS DE SUÍNOS

**Elisângela Olegário da Silva¹
Juliana Rubira Gerez²
Ana Paula F.R.L. Bracarense^{3*}**

ABSTRACT

Phytic acid (IP6) is a potent antioxidant present in several natural foods. Beneficial effects on inflammatory bowel diseases and colon cancer have been associated to IP6 in several studies; however, no data about the effect on small intestine are available. The purpose of the present study was to evaluate the effect of different doses of IP6 from rice and corn on intestinal morphology, cellular proliferation, apoptosis and Cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression by swine jejunal explants as experimental model. This report demonstrated that explants treated with 0.5 mM, 2.5 mM and 5 mM of IP6 from rice and 2.5 mM and 5 mM from corn showed higher villi compared to control. Explants treated with 2.5 mM and 5 mM IP6 from rice exhibited a significant reduction on intestinal histological changes. The cellular proliferation decreased in the explants treated with the dosages of 2.5 mM and 5 mM from rice.

² Médica Veterinária; Mestranda Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR; Docente da Faculdade Integrado de Campo Mourão, Campo Mourão-PR.

² Bióloga; Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR.

³ Médica Veterinária; Professora Doutora/DMVP/Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR

*Corresponding author: Universidade Estadual de Londrina

Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380 | Campus Universitário -Cx. Postal 10.011 | CEP 86.057-970 | Londrina – PR. Tel: (43) 3371-4062; E-mail: ana.bracarense@pq.cnpq.br

Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista Ciência e Agrotecnologia

A significant decrease in cell apoptosis was observed in the treatments with 2.5 mM IP6 from rice and 5 mM IP6 from corn. The explants treated with 2.5 mM and 5 mM IP6 from rice and corn showed a significant reduction of Cox-2 expression. Higher dosages of IP6 used in this experiment, increased the viability and preservation of intestinal tissue during *in vitro* incubation as evidenced by morphological and immunohistochemical assays.

Index terms: IP6, natural antioxidant, protective effect, jejunum, swine, explants technique

RESUMO

O ácido fítico (IP6) é um potente antioxidante presente em diversos alimentos naturais. Estudos demonstram os efeitos benéficos do IP6 sobre as doenças inflamatórias intestinais e câncer de cólon; no entanto, não há dados sobre a ação do IP6 no intestino delgado. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos em diferentes doses de IP6 de arroz e milho sobre a morfologia intestinal, proliferação celular, apoptose e expressão da ciclo-oxigenase-2 (Cox-2) usando explantes jejunais de suínos como modelo experimental. Este estudo demonstrou que explantes tratados com 0,5 mM, 2,5 mM e 5 mM de IP6 de arroz e 2,5 mM e 5 mM de milho apresentaram maior altura de vilosidades quando comparados ao controle. Explantes tratados com 2,5 mM e 5 mM de IP6 de arroz evidenciaram uma significativa redução nas alterações histológicas intestinais. A proliferação celular diminuiu nos explantes tratados com as doses de 2,5 e 5 mM de arroz. Significativa redução na apoptose ocorreu nos tratamentos com 2,5 mM de IP6 de arroz e 5 mM de milho. Os explantes tratados com 2,5 mM e 5 mM de IP6 de arroz e milho mostraram uma redução significativa na expressão de Cox-2. As doses mais altas de IP6 usadas neste experimento, aumentaram a viabilidade e preservação do tecido intestinal durante a incubação *in vitro*, evidenciada pelos exames morfológicos e imuno-histoquímico.

Termos para indexação: IP6, antioxidante natural, efeito protetor, jejuno, suíno, técnica de explante

INTRODUCTION

Phytic acid (IP6, InsP6, IP6, inositol hexaphosphate or myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakis phosphate) is a natural antioxidant present in cereals, legumes, nuts, oil seeds, spores, needles and pollen, compounding approximately 1-5% of weight and, accounting for 60-90% of the total seed phosphorus (Lolas et al. 1976; Graf & Eaton 1990). In rice and corn, cereals widely consumed by humans and animals, IP6 is concentrated mainly in the pericarp and the germ, representing 2.2% and 6.4% of weight, respectively (Graf & Eaton 1990).

During the storage, fermentation, germination, and digestion of cereals, IP6 can be dephosphorylated to lower phosphoric esters of myo-inositol (IP5, IP4, IP3, IP2 and IP) by action of the endogenous phytase or by acid hydrolysis and enzymatic treatment with phytase (Burbano et al. 1995). IP4 and IP3 play an important role in cell signalling and calcium mobilization (Shamsuddin et al., 1999). IP6 and IP5 are present within the cells in substantial amounts (10 μ M to 1 mM). These levels are much higher than any other inositol phosphates (Szwergold et al., 1987), inducing a high capacity to bind minerals (Sandberg et al., 1989).

The effects of IP6 have been demonstrated in different pathological conditions as inhibition of platelet aggregation (Vucenik et al., 1999), reduction of serum lipids (Onomi et al., 2004), prevention of cardiovascular diseases (Grases et al. 2006), kidney stone formation (Grases et al. 1996), and inflammatory bowel diseases (Graf & Eaton 1985), as well as a protective effect in neurodegenerative diseases (Xu et al., 2008; Anekonda et al. 2011). Moreover, several *in vitro* (Tantivejkul et al., 2003; Gu et al. 2009, Kapral et al. 2012) and *in vivo* studies using animal models (Shamsuddin et al., 1999; Challa et al., 1997; Lee et al., 2005; Khatiwada et al. 2011) described a decrease in the development of several cancers. The

antineoplastic effect is a consequence of increased apoptosis, and decreased tumor cell proliferation, metastasis, and preneoplastic lesions (Matejuk & Shamsuddin, 2010). Some clinical studies suggested that IP6 potentiated the action of chemotherapeutic drug and minimized symptoms in people with breast and colon cancer (Druzijanic et al. 2004, Bacic et al. 2010).

The hypothesis for IP6 antioxidant and anticarcinogenic action is the inhibition of reactive oxygen species (ROS) generation as a result of a strong chelation with iron (Graf & Eaton 1985). The mechanisms of degradation and hydrolysis of IP6 in the gastrointestinal system have been elucidated (Schlemmer et al. 2001); however, no data about the effect of IP6 on small intestine morphology are available. The interactions and pathways modulated by IP6 from different origins and a possible beneficial result in the gastrointestinal tract remain unknown.

We used the swine as experimental model based on physiological and morphological similarities with the human gastrointestinal tract, as well as in the absorption of IP6 (Schlemmer et al. 2001). The explant culture technique used in this experiment permits the evaluate tissue morphology, maintaining the complex patterns of differentiation seen *in vivo* (Randall et al., 2011). In this study, we investigated the effects of IP6 from rice and corn in different doses on intestinal morphology, cellular proliferation, apoptosis and Cox-2 expression using swine jejunal explants.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Six healthy 24-days-old crossbred (Landrace x Large White X Duroc) piglets (7.2 kg \pm 0.63) were used in the present study. All animal experimentation procedures were carried out

in accordance with the Ethics Committee on the use of animals (CEUA/UEL/Brazil-process n° 8022.2012.40).

Phytic acid

The phytic acid dodecasodium salt from rice (MW: 1080) and corn (MW: 1044) were purchased from Sigma –Aldrich (St. Louis, MO). The salts were dissolved in distillate water, the pH adjusted to 7.2 and the solution stored at -20°C. The range of IP6 concentration used in this study (0.5 mM, 1.0 mM, 2.5 mM and 5 mM) was chosen to encompass levels previously used with IPEC-1 (Intestinal Porcine Epithelial Cells) cell line (Pacheco et al. 2012).

Jejunal explants technique

The piglets were euthanized by administration of acepromazine 1% (0.1 mL/10kg) IM, sodium pentobarbital (40 mg/kg) IV and subsequently KCl 15% solution IV. The jejunum was rapidly excised, and fragments of 5 cm length were collected and washed with buffer solution. The explants were collected using a punch of 8 mm diameter. From each animal six explants were collected for each treatment. The total number of explants from each pig was 54. The explants collected were laid in six well plates (three explants/well) with 3mL of the following treatments: control - only culture media (DMEM- Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco- BRL Life Technologies, Carlsbad, CA) plus penicillin/streptomycin (1.25 µL/mL, Gibco- BRL Life Technologies, Carlsbad, CA), gentamicin (10 µL/mL, Novafarma, Goiás, Brazil), fetal bovine serum (100 µL/mL, Invitrogen, São Paulo, Brazil) and L- glutamine (0.4 µL/mL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); culture media with IP6 from corn (0.5 mM, 1.0 mM, 2.5mM, 5 mM) and culture media with IP6 from rice (0.5 mM, 1.0 mM, 2.5mM, 5 mM). The explants were incubated during four hours at 37°C under orbital shaking and 5% of CO₂. All the experimental procedures were performed in duplicated.

Histological assessment

After the incubation period, the explants were fixed in 10% neutral buffered formalin solution and routinely processed for histopathological and immunohistochemical evaluation. An intestinal histological score previously described (Bracarense et al. 2012) was adapted to compare histological changes between the treatments. The maximum score (22 points) indicates the overall integrity of the intestine. Each explant was evaluated to observe the presence and intensity of the criteria disposed on table 1.

Table 1. Histological criteria score used to establish the jejunal lesional score*

Type of lesion	Severity score	Maximal total score
Villi atrophy	0-2	22
Villi fusion	0-2	
Interstitial edema	0-2	
Lymphatic vessel dilation	0-2	
Loss of apical enterocytes	0-2	
Cell vacuolation	0-2	
Necrotic debris	0-2	
Microvilli homogeneity	0-2	
Enterocytes morphology [#]	0-3	
Number of villi [•]	0-3	

* The jejunal score of each treatment was obtained by the sum of each lesion score. The severity score was determined as: 0-diffuse; 1-local; 2-absent; # Columnar epithelium (3); cuboid epithelium (2); flattened epithelium (1); no epithelium (0).

• > 25 villi/explant (3); 15-25 villi (2); < 15 villi (1) and no villi (0).

The total score was calculated by taking into account the sum of each histological criteria. Villi height was measured randomly on 10 villi using the Motic Image Plus 2.0 software (Motic Instruments, Richmond, Canada). Sections of jejunum were submitted to Alcian blue staining to evaluate goblet cell density. Positively stained goblet cells were counted randomly in 10 villi per explant at 400X magnification.

Immunohistochemical assessment

Evaluation of cell proliferation, apoptosis and Cox- 2 expression were performed using antibodies against Ki-67 (clone 7B11, 1:50 dilution, Zymed, Carlsbad, CA) and cleaved

caspace-3 (Casp3) (clone Asp 175, 1:200 dilution, Cell Signalling Technology, Beverly, MA) and Cox-2 (clone CX-294, 1:100 dilution, Dako, Glostrup, Denmark), respectively. The protocols, positive and negative controls were used according to manufacturer's instructions. The immunoexpression of Casp3 and Ki-67 was estimated by counting strongly positive immunostaining of cytoplasm and nucleus cells, respectively, in five random fields in crypt region /explant at 400X magnification. The expression of Cox-2 was estimated by evaluation of positive immunostaining of cytoplasm cells in five fields in crypt region/explant at 200x magnification. Fields were considered positive when it showed 75% or more positive immunostaining cells.

Statistical analysis

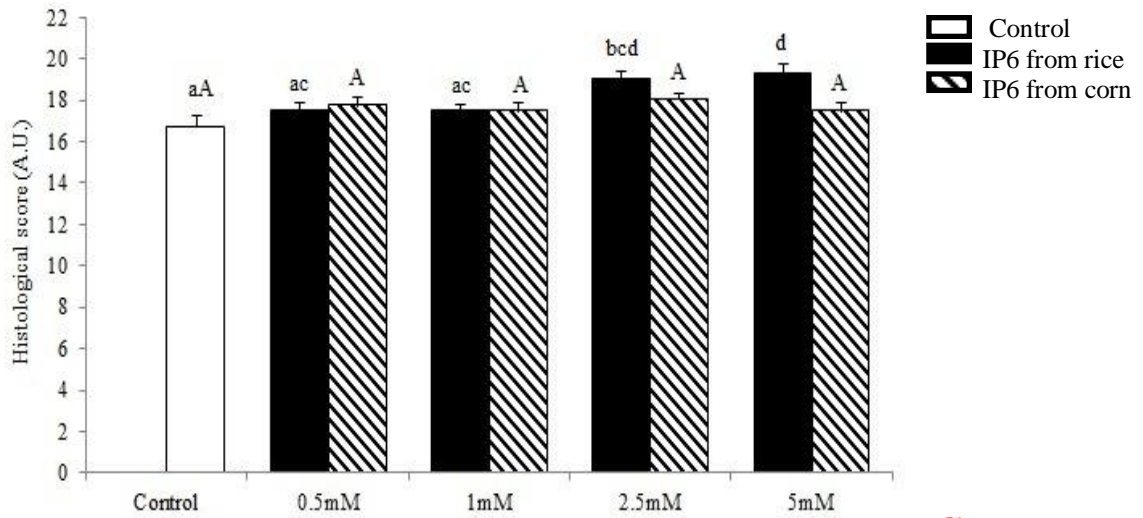
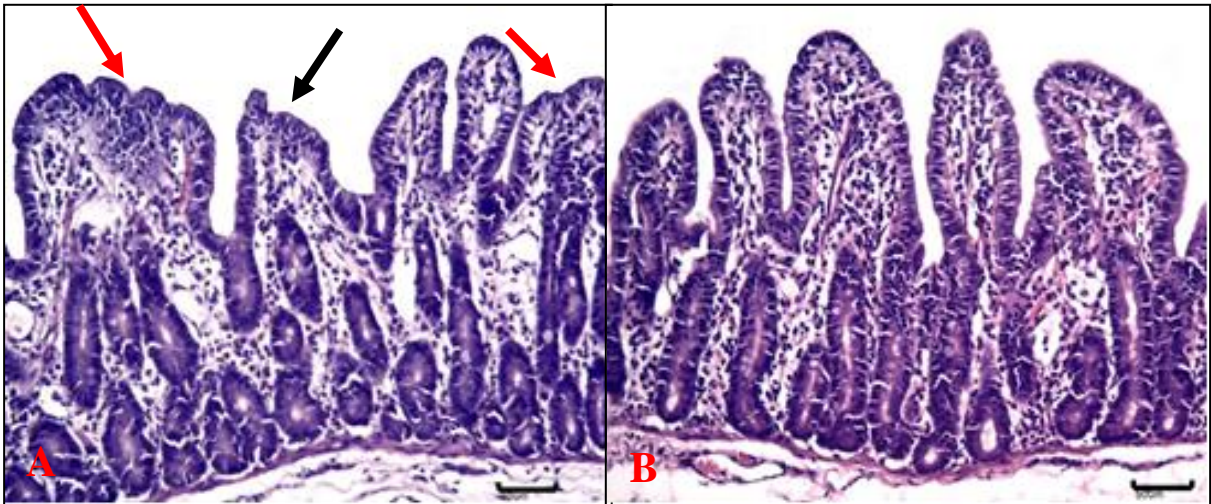
The experimental design used in the present study was entirely randomized with six replicates (each explant represent one replicated). The means of lesional score, intestinal morphometry, number of goblet cells and positive immunostaining for Ki-67 and Casp3 and the sum of the positive and negative immunostaining fields for Cox-2 were used for statistical analysis. Data were statistically analyzed by the free *software* R 2.11.1 using normality (Shapiro-Wilk's test) and homogeneity (Bartlett) tests. When these two assumptions were met, the analysis of variance (ANOVA) was applied, followed by Tukey's test and presented with their standard errors to Ki-67, Casp-3. The data of Cox-2 expression were exhibited in percentage of positive and negative immunostaining. P values of ≤ 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

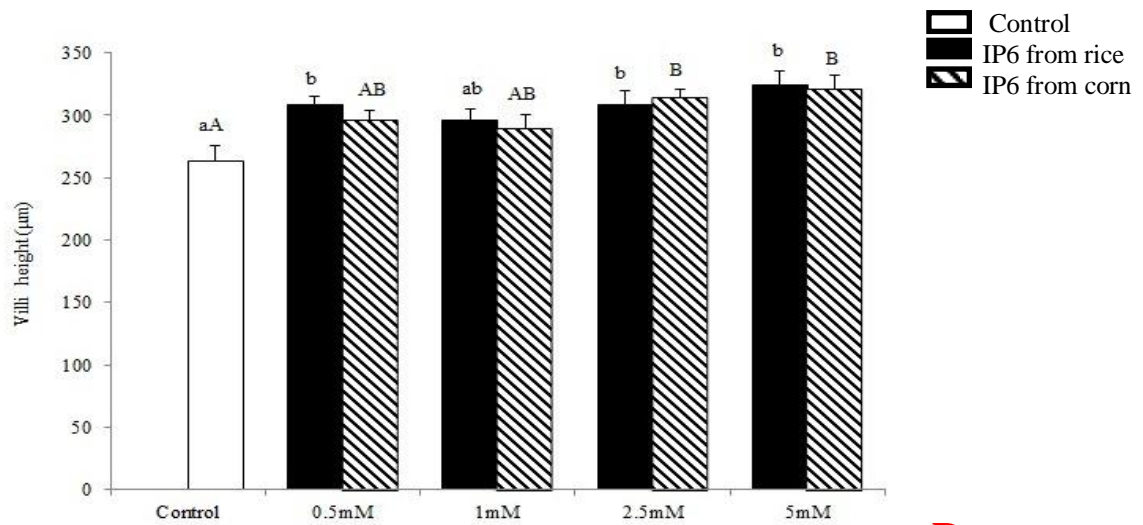
After four hours of incubation, untreated explants presented mild to moderate multifocal atrophy and villi fusion. On the other hand, explants exposed to IP6 showed normal villi height and morphology (Fig. 1A-B). The control explants showed a mean

histological score of 16.74. A significant increase in the score was observed in explants treated with 2.5 mM (19.0; $P = 0.006$) and 5 mM (19.35; $P = 0.001$) of rice IP6, whereas the doses of 0.5 mM and 1.0 mM induced no difference compared to control explants. No significant difference was observed in explants treated with corn IP6 in all experimental doses when compared with untreated explants ($P > 0.05$) (Figure 1C).

Explants exposed to IP6 exhibited higher villi compared to control. This difference was significant for IP6 from rice in the concentrations of 0.5 mM (17%; $P = 0.043$), 2.5 mM (17%; $P = 0.038$) and 5 mM (23%; $P = 0.01$), and 2.5 mM (19%; $P = 0.011$) and 5 mM (20%; $P = 0.003$) of corn IP6 (Figure 1D). The mean of goblet cells per villi was 4.1 for control explants. Explants incubated with rice and corn IP6 showed a non-significant increase in the number of goblet cells in all treatments ($P > 0.05$) (data not shown).



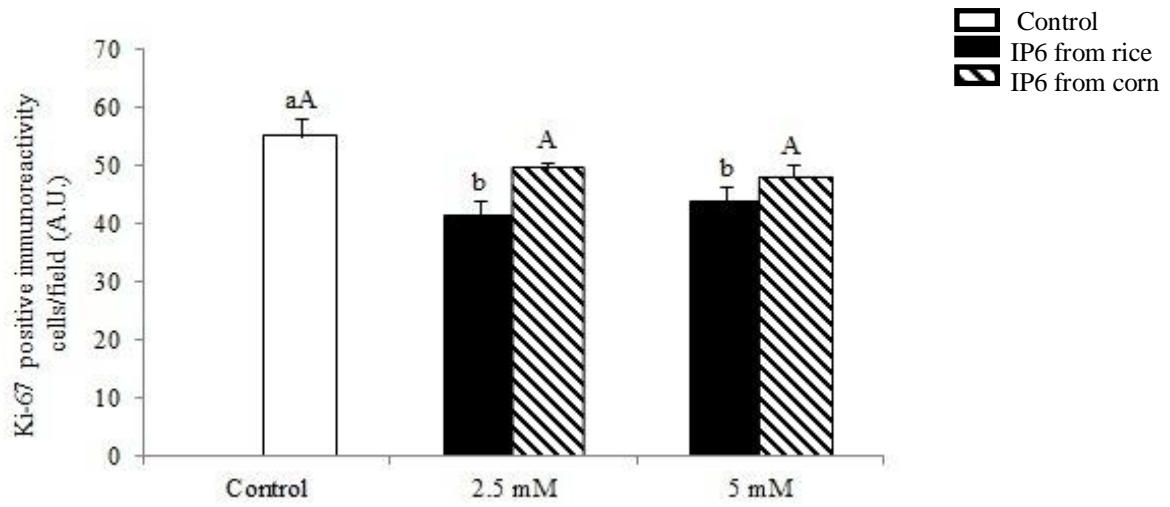
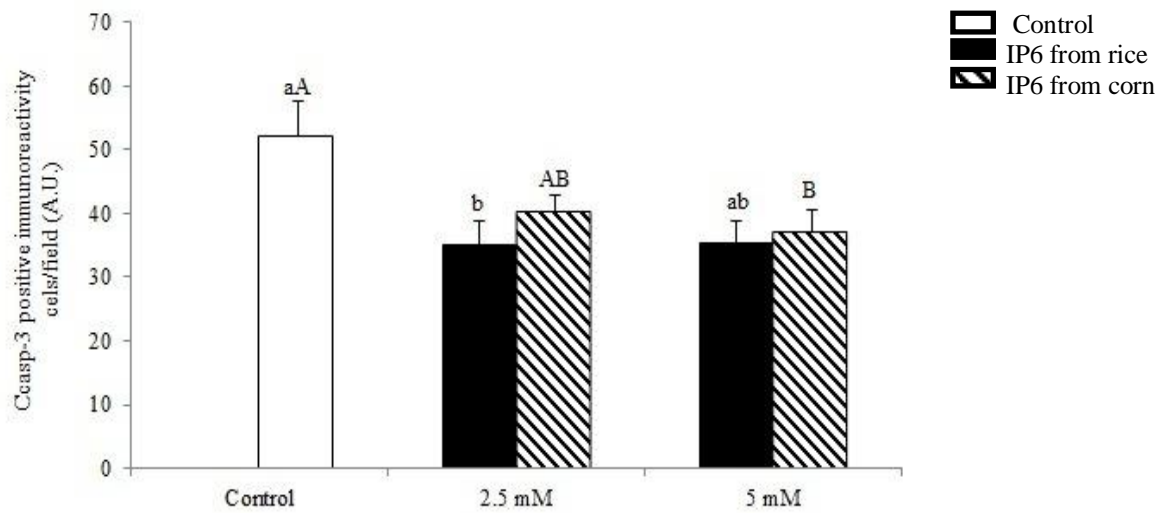
C

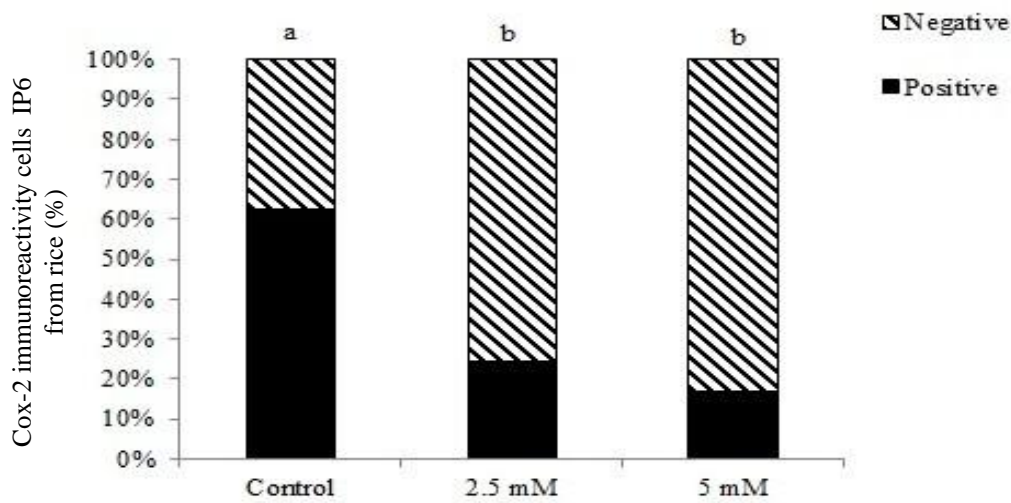


D

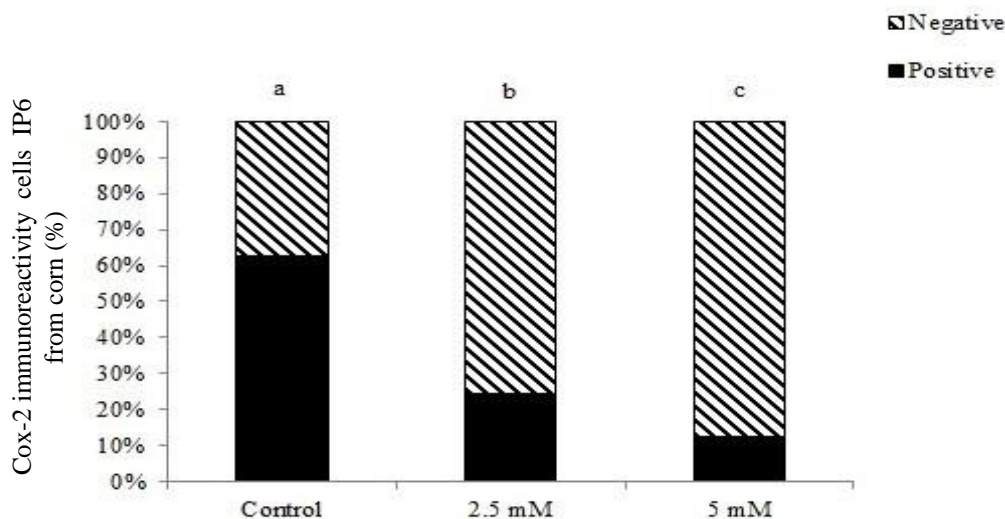
Figure 1. Effect of IP6 from rice and corn on jejunum explants histology. **A-** Control with moderate lesions, villi atrophy (black arrow) and villi fusion (red arrows), H&E, bar 50 μm . **B-** Jejunal explant incubated with 5 mM IP6, H&E 50 μm . **C-** Histological score after examination according to the occurrence of lesions in explants submitted to IP6 from rice and corn. (AU-Arbitrary units). **D-** Villi height of explants submitted to IP6 from rice and corn. Values are mean height (μm). Values are means with standard errors of the mean represented by vertical bars (n 6 animals). Mean values with unlike letters were significantly different ($P < 0.05$).

Cell proliferation, apoptosis and Cox-2 expression were evaluated using an immunohistochemical assay. We have chosen explants exposed to 2.5 mM and 5 mM of IP6 considering that these treatments have improved intestinal morphology. A significant reduction in the number of positive Ki-67 cells was verified in explants incubated with 2.5mM (32.8%; $P = 0.005$) and 5 mM (32.1%; $P = 0.001$) of rice IP6 compared to control explants (Fig. 2A; Fig. 3A-B). The explants treated with 2.5 mM and 5 mM of corn IP6 showed no significant reduction of 10% and 13% respectively ($P > 0.05$) compared to control explants (Figure 2A). A significant decrease in the number of apoptotic cells was observed in explants treated with 2.5 mM of rice IP6 (25%; $P = 0.003$) and 5 mM of corn IP6 (13%; $P = 0.05$) when compared to control samples (Fig. 2B; Fig. 3C-D). The immunoexpression of Cox-2 in the explants treated with 2.5 mM and 5 mM from rice and corn showed a reduction of 62% ($P = 2.484\text{E-}10$) and 76% ($P = 8.063\text{E-}14$), and 64% ($P = 6.451\text{E-}10$) and 82% ($P = 4.691\text{E-}17$), respectively as compared with the control group (Fig. 2C-D).

**A****B**



C



D

Figure 2. Effect of IP6 from rice and corn on jejunum explants cellular proliferation, apoptosis and Cox-2 expression. Immunohistochemistry using the immunoperoxidase method and hematoxylin counterstain. A- Positive cell immunostaining for Ki-67 in explants submitted to 2.5mM and 5 mM from rice and corn. Values are mean positive cells per field. B- Immunostaining for Ccasp3 in explants submitted to 2.5mM and 5 mM from rice and corn. Values are mean positive cells per field. Values are means with standard errors of the mean represented by vertical bars (n 6 animals). C- Immunostaining for Cox-2 in explants submitted to IP6 from rice. D. Immunostaining for Cox-2 in explants submitted to IP6 from rice. Values are expressed as percentage of positive and negative immunostaining fields represented by vertical bars (n 6 animals). Unlike letters were significantly different ($P < 0.05$).

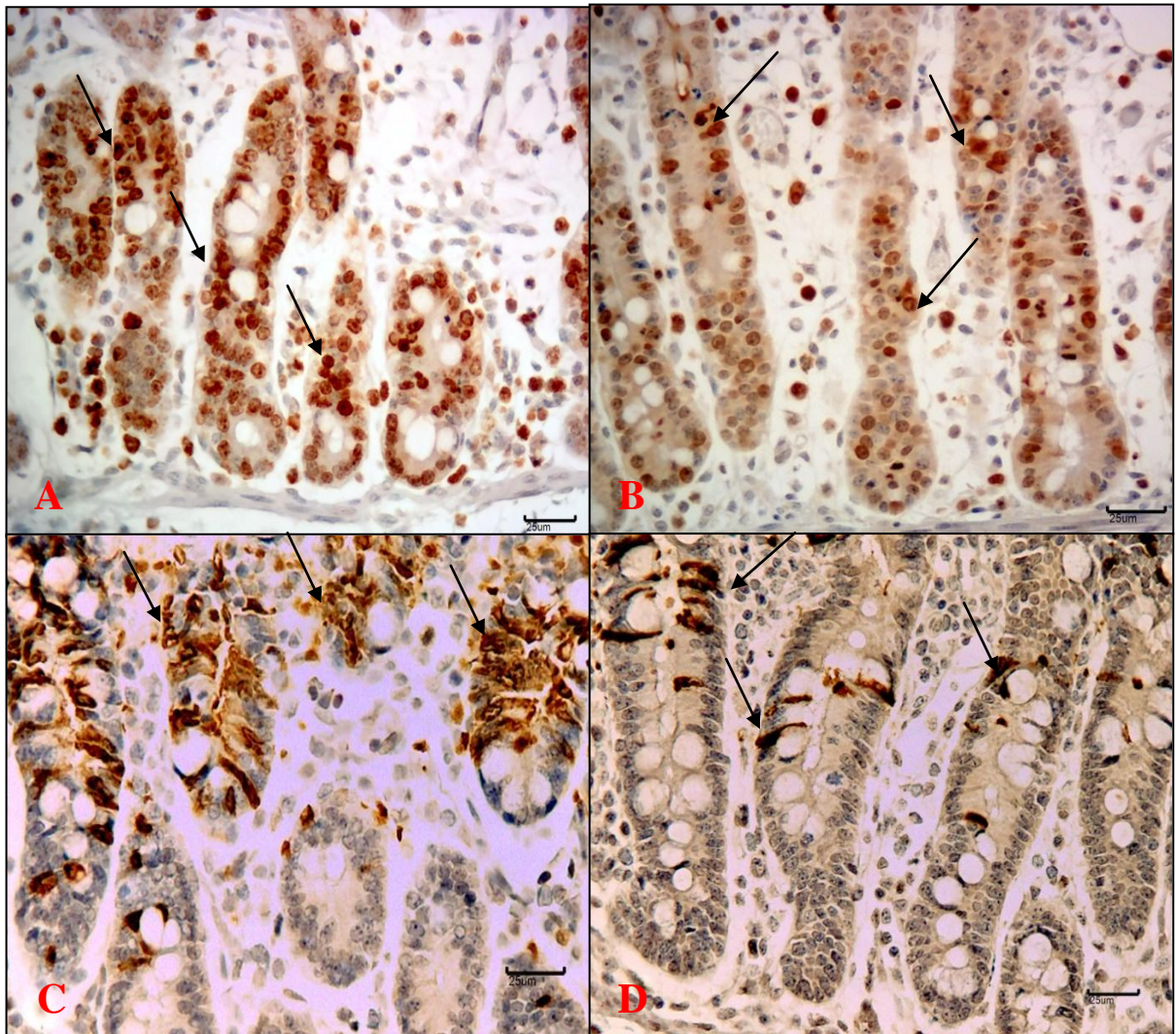


Figure 3. Effect of IP6 on jejunum explants on cellular proliferation, apoptosis and Cox-2 expression. Nuclear immunohistochemical staining for Ki-67 and cytoplasmic immunohistochemical staining for Ccasp3. **A.** Ki-67, Control, (nuclear staining, arrows), bar 25 μ m. **B.** Ki-67, IP6 5 mM from rice, (nuclear staining, arrows), bar 25 μ m **C-** Ccasp3, Control, bar 25 μ m (cytoplasmic staining, arrows). **D.** Ccasp3, IP6 5 mM from rice, bar 25 μ m (cytoplasmic staining, arrows).

In the present study, we have investigated the effect of different doses of phytic acid from rice and corn on the intestine of piglets in order to determine if they have an effect on jejunal morphology, cell turnover and pro-inflammatory stimuli. IP6 exerts its effects in a dose-dependent manner (Graf & Eaton, 1990) which can explain the response to greater doses of phytic acid. In an *in vitro* study, IPEC-1 cells exposed to 0.5 and 1 mM of phytic acid protected cells from deoxynivalenol toxicity, whereas doses of 5 mM induced cell toxicity

(Pacheco et al. 2012). We have observed that the IP6 from rice was more efficient to preserve the intestinal morphology compared to IP6 from corn. We hypothesize that the different number of sodium and water molecules present in the IP6 from rice ($C_6H_6O_{24}P_6 \cdot 12Na \cdot 8H_2O$) and from corn ($C_6H_6O_{24}P_6 \cdot 11Na \cdot 7H_2O$) could interfere with the absorption of IP6 by intestinal cells reflecting the difference in morphological preservation observed in this experiment.

This improvement in the intestinal preservation could be seen by a decrease in villi fusion and atrophy, as well as normal enterocytes morphology. In this study, villi were significantly higher in explants exposed to concentrations of 2.5 and 5 mM of both phytic acids. An increased villous surface implicates an augmentation in intestinal absorptive capacity (Wijten et al., 2011). Goblet cells secrete a mucus layer that promotes the first line of defence on intestine (Kim & Ho 2010). We observed no difference in goblet cell density in explants submitted to different doses of phytic acid. Probably, the short period of incubation (four hours) was not sufficient for goblet cells migration from crypts to villi.

Time of incubation is a limitation in the *ex vivo* model. In previous studies we have observed an increase in histological changes (30%) in explants incubated for 4 hours compared to non-incubated explants (unpublished data). The explants are submitted to a relative status of hypoxia. Whenever oxygen level decrease in the surrounding environment, the mitochondria increase the levels of cytosolic reactive oxygen species (ROS) to activate hypoxia-inducible factor (HIF) with the objective to facilitate cellular adaptation to hypoxia (Bell et al. 2007). However, if the cell remain submitted to persistent hypoxia as in the present study, the ROS production increases and the intracellular antioxidants (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, vitamins E and C) fail to inhibit the cell injury induced by the lipid peroxidation caused by the ROS action (Myers et al., 2012). Furthermore, ROS can activate the MAPKs (mitogen-activated protein kinases) that have been associated to cell

proliferation, apoptosis and regulation of Cox-2 gene (Wang et al. 1998). Cox-2 is an enzyme involved in arachidonic acid metabolism and is not expressed in most of the normal tissues, but is strongly induced by mitogenic and proinflammatory stimuli. High levels of Cox-2 have been reported in inflammatory bowel disease and colon cancer (Cianchi et al. 2006). In this study, we observed that the IP6, mainly from rice, decreased the cell proliferation, apoptosis and Cox-2 expression due their antioxidant potential by inhibition of ROS production and capacity of modulate the signaling intracellular to preserve the tissue viability.

IP6 can interfere with the Fenton reaction, stabilizing the iron in the Fe³⁺ (inert form) (Graf & Eaton, 1985), enabling a signalling for cellular adaptation to hypoxia, inhibiting the activation of MAPKs and preventing cellular injury, proliferation, apoptosis and Cox-2 expression by the inhibition of ROS production as observed in this experiment. The preservation of cellular morphology, increased villi height and decreased apoptosis and cell proliferation, promoted increased intestinal homeostasis and integrity, and in consequence better absorption of nutrients and defence against aggressors.

CONCLUSION

In conclusion, the IP6 from rice increased the viability and preservation of intestinal tissue by improvement on intestinal morphology, decrease of cellular proliferation, apoptosis and Cox-2 expression and the IP6 from corn increased the villi height and decreased the apoptosis and the Cox-2 expression. Nevertheless, more studies are necessary to elucidate biochemical pathways and molecular mechanisms of IP6 on the gastrointestinal tract and possible protective effects against infectious agents and xenobiotics.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by Grant n° 305274/2011-2 from CNPq, Brazil. E.O.S. and J.R.G.

were supported by fellowships from CAPES. A.P.F.R.L.B. was supported by fellowship from CNPq. The authors wish to thank the Professor Dr. Caio Abércio da Silva for the supply and care of the animals and the Professor Dr. Elza Iouko Ida for helpful discussion about the antioxidant effect of phytic acid.

REFERENCES

- ANEKONDA, T.S., WADSWORTH, T.L., SABIN, R., FRAHLER, K., HARRIS, C., PETRIKO, 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**, Birmingham, v.23, n. 1, p. 21-35, jan, 2011.
- BACIC, I., DRUZIJANIC, N., KARLO, R., SKIFIC, I., JAGIC, S. Efficacy of IP6+inositol in the treatment of breast cancer patients receiving chemotherapy: prospective, randomized, pilot clinical study. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, London, v. 29, n. 12, p. 1-5, feb, 2010.
- BELL, E.L., KLIMOVA, T.A., ESENBART, J., MORAES, C.T., MURPHY, M.P., BUDINGER, G.R.S., CHANDEL, N.S. The Q₀ site of the mitochondrial complex III is required for the transduction of hypoxia signaling via reactive oxygen species production. **The Journal of Cell Biology**, Nova York, v.177, n.6, p.1029-1036, jun, 2007.
- BRACARENSE, A-P.F.L., LUCIOLI, J., GRENIER, B., PACHECO, G.D., MOLL, W-D., SCHATZMAYR, G., OSWALD, I. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. **British Journal of Nutrition**, London, v. 107, n. 2, p. 1776-1786, jun, 2012.
- BURBANO, C., MUZQUIZ, M., OSAGIE, A., AYET, G., CUADRADO, C. Determination of phytate and lower inositol phosphates in Spanish legumes by HPLC methodology. **Food Chemistry**, Netherlands, v. 52, n. 3, p. 321-325, 1995.
- CHALLA, A., RAO, D.R., REDDY, B. Interactive suppression of aberrant crypt foci induced by azoxymethene in rat colon by phytic acid and green tea. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 2023-2026, 1997.
- CIANCHI, F., CORTESINI, C., MAGNELLI, L., FANTI, E., PAPUCCI, L., SCHIAVONE, N., MESSERINI, L., VANNACCI, A., CAPACCIOLI, S., PERNA, F., LULLI, M., FABBRONI, V., PERIGLI, G., BECHI, P., MASINI, E. Inhibition of 5-lipoxygenase by MK886 augments the anti-tumor activity of celecoxib in human colon cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics, Philadelphia**, v. 5, n. 11, p. 2716-2726, 2006.
- DRUZIJANIC, N., JURICI, J., PERKO, K., KRALJEVIC, D. IP6 +inositol as adjuvant to chemotherapy of colon cancer: our clinical experience. **Anticancer Research**, Corfu, v. 24, 3475, 2004.

GRAF, E., EATON, J.W. Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate? **Cancer**, Atlanta, v. 56, n. 4, p. 717-718, 1985.

GRAF, E., EATON, J.W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, St. Louis, v. 8, n. 1, p. 61-69, 1990.

GRASES, F., GARCIA-FERRAGUT, L., COSTA-BAUZÁ, A., MARCH, J.G. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. **Nephron**, Los Angeles, v. 73, n. 4, p.561-568, 1996.

GRASES, F., SANCHIS, P., PERELLO, J., ISERN, B., PRIETO, R.M., FERNADEZ-PALOMEQUE, C., FIOL, M., BONNIN, O., TORRES, J.J. Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. **Frontier in Bioscience**, Irvine, v. 1, n.11, p.136-142, jan, 2006.

GU, M., ROY, S., RAINA, K., AGARWAL, C., AGARWAL, R. Inositol hexaphosphate suppresses growth and induces apoptosis in prostate carcinoma cells in culture and nude mouse xenograft: PI3K-Akt pathway as potential target. **Cancer Research**, Philadelphia, v. 69, n. 24, p. 1-17, dec, 2009.

KAPRAL, M., WAWSZCZUK, J., JURZAK, M., HOLLEK, A., WEGLARZ, L. The effect of inositol hexaphosphate on the expression of selected metalloproteinases and their tissue inhibitors in IL-1 β -simulated colon cancer cells. **International Journal of Colorectal Disease**, Heidelberg, v. 27, n. 11, p.1419-1428, nov, 2012.

KHATIWADA, J., VERGHESE, M., DAVIS, S., WILLIAMS, L.L. Green tea, phytic acid, and inositol in combination reduced the incidence of azoxymethane-induced colon tumor in fisher 344 male rats. **Journal of Medicinal Food**, Orlando, v. 14, n. 11, p.1313-1320, nov, 2011.

KIM, Y.S., HO, S.B. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. **Current Gastroenterology Reports**, Philadelphia, v. 12, n. 5, p. 319-330, oct, 2010.

LEE, H.J., LEE, S.A., CHOI, H. Dietary administration of inositol and/or inositol-6-phosphate prevents chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Korea, v. 6, n. 1, p. 41-47, jan-mar, 2005.

LOLAS, G.M., PALAMIDIS, N., MARKAKIS, P. The phytic acid-total phosphorus relation in barley, oats, soybeans and wheat. **Cereal Chemistry Journal**, St. Paul, v.53, n. 6, p. 867- 871, nov-dec, 1976.

MATEJUK, A.; SHAMSUDDIN, A. IP6 in cancer therapy: past, present and future. **Current Cancer Therapy Reviews**, v. 6, p. 1-12, 2010.

MYERS, R.K.; McGAVIN, D.; ZACHARY, J. Cellular adaptations, injury, and death: morphologic, biochemical, and genetic basis. In: ZACAHRY, J.F.; McGAVIN, M.D. (Eds). **Pathologic Basis of Veterinary Disease**. 5 th ed. St. Louis: Elsevier, 2012, p.2-49.

PACHECO, G.D., SILVA, C.A., PINTON, P., OSWALD, I.P., BRACARENSE, A.P.F.R.L. Phytic acid protects porcine intestinal epithelial cells from deoxynivalenol (DON) cytotoxicity. **Experimental and Toxicologic Pathology**, Hannover, v. 64, n. 4, p. 345-347, may, 2012.

ONOMI, S., OKAZAKI, Y., KATAYAMA, T. Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Tokyo, v.68, n. 6, p. 1379-1381, jun, 2004.

RANDALL, K.J., TURTON, J., FOSTER, J.R. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. **Cell Biology and Toxicology**, London, v. 27, n. 4, p. 267-284, aug, 2011.

SANDBERG, A-B., CARLSSON, N.G., SVANBERG, U. Effects of inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates on in vitro estimation of iron availability. **Journal of Food Science**, Malden, v. 54, n. 1, p. 159-161, jan, 1989.

SCHLEMMER, U., JANY, K. D., BERK, A., SCHULZ, E., RECHKEMMER, G. Degradation of phytate in the gut of pigs-pathway of gastro-intestinal inositol phosphate hydrolysis and enzymes involved. **Archives of Animal Nutrition**, Berlin, v. 55, n. 4, p. 255-280, 2001.

SHAMSUDDIN, A.M., ELSAYED, A.M., ULLAH, A. Suppression of large intestinal cancer in F344 rats by inositol hexaphosphate. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 9, n.4, p. 577-580, apr, 1999.

SZWERGOLD, B.S., GRAHMA, R.A., BROWN, T.R. Observation of inositol pentakis- and hexakis-phosphates in mammalian tissues by PNMR. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, London, v. 149, n. 3, p. 874-881, dec, 1987.

TANTIVEJKUL, K., VUCENIK, I., SHAMSUDDIN, A.M. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer metastasis: I. In vitro studies of adhesion, migration and invasion of MDA-MB 231 human breast cancer cells. **Anticancer Research**, Corfu, v.23, n. 5A, p. 671-679, sep-oct, 2003.

VUCENIK, I., PODECZASY, J.J., SHAMSUDDIN, A.M. Antiplatelet activity of inositol hexaphosphate (IP6). **Anticancer Research**, Corfu, v. 19, n. 5A, p. 3689- 3693, sep-oct, 1999.

WIJTEN, P.J., VAN DER, M., VERSTEGEN, M.W. Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. **British Journal of Nutrition**, London, v. 19, n. 5A, p. 967-981, sep-oct, 2011.

WANG, X., MARTINDALE, J.L., LIU, Y., HOLBROOK, N.J. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen- activated protein kinase signalling pathways on cell survival. **Biochemical Journal**, London, v. 333.n Pt 2, p. 291-300, jul, 1998.

XU, Q., KANTHASAMY, A.G., REDDY, M.B. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. **Toxicology**, Hamburg, v. 245, n. 1-2, p. 101-108, mar, 2008.

5 ARTIGO 2

Phytic acid decreases deoxynivalenol and fumonisin B1-induced changes on swine jejunal explants*

Abstract

Phytic acid (IP6) is a natural antioxidant that is associated with protective effects in several diseases, including cancer. Data on the effect of IP6 on mycotoxin exposure are scarce. The purpose of the present study was to investigate the effects of IP6 on the morphology, cell proliferation, apoptosis, cell adhesion and cyclooxygenase-2 expression in explants exposed to deoxynivalenol (DON) and fumonisin B1 (FB1). The explants were exposed for 4 hours to different treatments: control, DON (10 μ M), DON (10 μ M) plus 2.5 mM IP6 or 5 mM IP6, FB1 (70 μ M), and FB1 (70 μ M) plus 2.5 mM IP6 or 5 mM IP6. The explants were submitted to histological and immunohistochemical evaluation. Both mycotoxins induced significant intestinal lesions and decreased villi height. The presence of 2.5 mM and 5 mM IP6 significantly inhibited the changes caused by the mycotoxins. DON induced a significant increase in caspase-3 (83%) and Cox-2 (71.3%) expression compared with the control. The presence of 5 mM IP6 induced a significant decrease in caspase-3 (43.7%) and Cox-2 (48%) expression compared with the DON group. FB1 induced a significant increase in caspase-3 expression (47%) compared with the control. However, the presence of IP6 induced no significant change. Explants exposed to mycotoxins exhibited no changes in the expression of E-cadherin, p53 or Ki-67. A significant decrease in cell proliferation was observed when explants were exposed to both doses of IP6 in comparison with the DON and FB1 groups.

* Artigo editado de acordo com as normas de publicação da Revista Toxicology

The present data provide evidence that phytic acid modulates the toxic effects induced by DON and FB1 on intestinal tissue.

Keywords: IP6, protective effect, DON, FB1, jejunum, swine.

Abbreviations: IP6, phytic acid; DON, deoxynivalenol; FB1, fumonisin B1; Cox-2, cyclooxygenase-2; Ccasp3, cleaved caspase-3.

1. Introduction

The search for high-quality and healthy food is constantly increasing worldwide, leading to a great interest in natural antioxidants, mainly plant extracts and compounds, and their possible health benefits (Kulawik et al., 2013). The inositol hexaphosphate (IP6, InsP6, phytic acid) is a natural antioxidant widely present in cereals, legumes, nuts, oil seeds, spores, needles and pollen and corresponds to 1-5% of the weight of the cereals (Lolas et al., 1976; Graf, Eaton, 1990). Several studies have demonstrated the preventive and therapeutic effects of IP6 in different diseases, including inhibition of platelet aggregation (Vucenik et al., 1999), reduction of serum lipids (Onomi et al., 2004), protective effects in inflammatory bowel disease (Graf, Eaton, 1985) and neurodegenerative diseases (Anekonda et al., 2011), prevention of cardiovascular diseases (Grases et al., 2006), prevention of kidney stone formation (Grases et al., 1996) and inhibition of cancer development (Challa et al., 1997; Gu et al., 2009; Kapral et al., 2012; Khatiwada et al., 2011; Lee et al., 2005; Shamsuddin et al., 1999; Shamsuddin, Vucenik, 2005; Tantivejkul et al., 2003).

The intestine is a complex organ with several cell types and functions and serves as the primary barrier against the ingestion of chemicals, antigens, natural toxins and contaminated food (Bouhet, Oswald, 2005; Randall et al., 2011). Mycotoxins, such as deoxynivalenol (DON) and fumonisin B1 (FB1), induce toxic and immunotoxic effects on the

intestine of pigs (Bracarense et al., 2012). Mycotoxins are the most common contaminants of cereal grains found worldwide (Binder et al., 2007) and are considered a risk factor to human and animal health (Rodrigues, Naehrer, 2012).

The toxic effects of fusariotoxins have been reported in humans, pigs, experimental animals and *in vitro* models (Bouhet et al., 2006; Bracarense et al., 2012; Ueno et al., 1997; Zhou et al., 2003). Upon acute exposure to high doses of DON, animals exhibit diarrhea, vomiting, leukocytosis and hemorrhage (Ueno, 1984), whereas chronic exposure induces anorexia, reduced weight gain and nutritional efficiency, and changes to the neuroendocrine and immune systems (Pestka, Smolinski 2005). At the molecular level, DON acts to inhibit protein synthesis by binding to the 28S ribosomal RNA peptidyltransferase site, inducing the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), promoting apoptosis, and inducing changes in cytokine gene expression (Chen et al., 1998; Pestka 2008) and a decrease in the expression of cell adhesion proteins (Bracarense et al., 2012; Pinton et al., 2010; Van De Walle et al., 2010).

Exposure to cereals contaminated with FB1 causes pulmonary edema in pigs (Gumprecht et al., 1998), leukoencephalomalacia in horses (Kellerman et al., 1990), liver and kidney cancer in rats (Gelderblom et al., 2001; Voss et al., 2001) and esophageal cancer and neural tube defects in humans (Gelineau-Van Waes et al., 2012; Wang et al., 2000). At the cellular level, FB1 inhibits ceramide synthase, blocking the synthesis of sphingolipids, a class of membrane lipids that plays an important role in cell signaling transduction pathways and cell growth, differentiation and death (Merril et al., 1993; Soriano et al., 2005).

In a previous study, we demonstrated that IP6 modulates the toxic effects induced by DON exposition on IPEC cells (Pacheco et al., 2012). In this study, we are interested in evaluating the effects of phytic acid on an *ex vivo* model exposed to DON and FB1, the most common fusariotoxins that contaminate cereals. Furthermore, we focus on the search for

compounds that can inhibit or inactivate the action of these mycotoxins. The beneficial effects of IP6 have been demonstrated in several diseases; however, there are few reports on IP6 action during mycotoxin exposure (Abu El Saad et al., 2009; Pacheco et al., 2012). The choice of the swine as the experimental model was based on the physiological and morphological similarities with the human gastrointestinal tract as well as similarities in the absorption of IP6 (Schelemmer et al., 2001; Schelemmer et al., 2009). The explant culture technique used in this experiment permits the evaluation of tissue morphology, maintaining the complex patterns of differentiation observed *in vivo* and permitting the use of fewer experimental animals (Randall et al., 2011). The aim of this study was investigate the effect of IP6 on jejunal explants exposed to DON and FB1, focusing on intestinal morphology, cell proliferation and apoptosis. The expressions of a cell junction protein and cyclooxygenase-2 were also analyzed.

2. Material and Methods

2.1 Animals

Six 24-days-old crossbred (Landrace x Large White X Duroc) piglets ($7.9 \text{ kg} \pm 0.72$) were used in the present study. All animal experimentation procedures were performed in accordance with the ethics committee on the use of animals (CEUA/UEL/Brazil-process n° 8022.2012.40).

2.2 Phytic acid

Phytic acid (inositol hexaphosphoric acid) dodecasodium salt from rice (MW: 1080) was purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The salt was dissolved in distilled water and the pH was adjusted to 7.2 before the solution was passed through a membrane filter. The resultant solution was stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ before dilution in explant culture media. The

IP6 concentrations used in this study (2.5 mM and 5 mM) was chosen to encompass levels previously used in an experiment with explants of jejunum swine (data not published).

2.3 DON and FB1 mycotoxins

The purified DON (MW: 296.32) and FB1 (MW: 721.83) mycotoxins were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and the Cayman Chemical Company (Michigan, USA), respectively. The mycotoxins were dissolved in ultrapure water at final dilution of 10 μ M for DON and 70 μ M for FB1 and stored at 4 °C. The concentration of mycotoxins used were equivalent to 3 mg kg⁻¹ feed and 50.5 mg kg⁻¹ feed for DON and FB1, respectively.

2.4 Jejunal explants technique

The jejunum was chosen because previous studies have identified this region as a target of the toxic action of DON and FB1 (Bracarense et al., 2012). The piglets were euthanized by the administration of acepromazine 1% (0.1 mL/10 Kg) IM, sodium pentobarbital (40 mg/Kg) IV and, subsequently, KCl 15% solution IV. The jejunum was rapidly excised, and samples 5 cm in length were collected, washed with buffer solution and opened longitudinally. The explants were collected using a punch 8 mm in diameter. From each animal six explants were collected for each treatment. The total number of explants from each pig was 42. The explants collected were laid in six well plates (three explants/well) with 3mL of the following treatments: control (A, B and C) - only culture media (DMEM-Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco) plus penicillin/streptomycin (1.25 μ L/mL-Gibco), gentamicin (10 μ L/mL-Novafarma), fetal bovine serum (100 μ L/mL-Invitrogen) and L-glutamine (0.4 μ L/mL- Sigma Aldrich); culture media with IP6 2.5 mM (D and E); and culture media with IP6 5 mM (F and G). The explants were incubated at 37 °C under orbital shaking. After one hour, DON (10 μ M) was added in the B, D and F treatments, and FB1 (70 μ M) in the C, E and G treatments. The explants were returned to incubation for three more

hours. The total time of incubation (four hours) was chosen to encompass the times previously used in an experiment with explants of swine jejunum (Kolf-Clauw et al., 2009). All the experimental procedures were performed in duplicated.

2.5 Histological assessment

After the incubation period, the explants were fixed in 10% neutral buffered formalin, dehydrated in alcohols and embedded in paraffin. Sections of 5 μm were stained with hematoxylin-eosin (HE) for histopathological evaluation. An intestinal histological score previously described (Bracarense et al., 2012) was adapted to compare the histological changes between the treatments. The frequency and severity of each lesion was evaluated on a scale in which the maximal total score was 22 points (Table 1). The villi height was measured randomly on 10 villi using an image analysis system (MOTIC Image Plus Motic Instruments, Richmond, Canada). Sections of the jejunum were submitted to Alcian blue staining to evaluate goblet cell density. Positively stained goblet cells were counted randomly in 10 villi per explant at 400X magnification.

2.6 Immunohistochemical assessment

The evaluation of cell junction expression, cell proliferation, apoptosis and cyclooxygenase-2 expression were performed using antibodies against E-cadherin (anti-4A2C7, 1:50, Zymed), Ki-67 (anti-7B11, 1:50 dilution, Zymed), cleaved caspase-3 (Casp3) (anti-Asp 175, 1:200 dilution, Cell Signaling Technology, Inc.) and Cox-2 (anti-CX-294, 1:100 dilution, Dako), respectively. An anti-p53 antibody (anti-BP53.12, 1:50 dilution, Zymed) was used to evaluate the expression of p53. Samples of jejunum were analyzed on formalin-fixed and paraffin-embedded sections. Tissue sections were deparaffinized with

xylene and dehydrated through a graded ethanol series. The positive and negative controls were used according to the manufacturer's instructions.

Heat-mediated antigen retrieval was performed by heating the sections immersed in EDTA buffer, pH 9.0, in a microwave oven (750 W) for 10 minutes for E-cadherin, Ki-67, Cox-2, and p53 staining and for 17 minutes for Ccasp3 staining. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubation in a methanol- H₂O₂ (100: 50 mL) solution, whereas for Ccasp3 and Cox-2, a blocker protein (Dako) was also used for 30 minutes. The sections were incubated overnight at 4 °C with the primary antibody. The polymer secondary antibody (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) was applied for 30 minutes, followed by the addition of a chromogen (3,3-diaminobenzidine). Finally, the tissue sections were counterstained with hematoxylin and mounted on coverslips using a permanent mounting medium.

The positive immunoexpression of Ccasp3, p53 and Ki-67 was estimated by counting strongly positive immunostaining of the cytoplasm (Ccasp3) and nucleus (p53, Ki-67) in five random fields in the crypt region /explant at 400x magnification. The expression of E-cadherin was estimated by the evaluation of five fields at 200x magnification. The staining was considered positive when homogeneous and strong basolateral membrane staining of the enterocytes was observed. The expression of Cox-2 was estimated by evaluating five fields in the crypt region at 200x magnification. Fields were considered positive when 75% or more of the cells were immunostained.

2.7 Statistical analysis

The experimental design used in the present study was entirely randomized with six replicates (each explant represent one replicated). The means of the lesional score, intestinal morphometry, number of goblet cells, positive immunostaining for Ki-67, p53, and Ccasp3 and the number of positive fields for E-cadherin and Cox-2 were used for statistical analysis.

The data are presented as the means with their standard errors and were analyzed using the free software Action 2.3 (Campinas, SP, Brazil). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by a multiple comparison procedure (Tukey test) was used for statistical analysis. Fisher's test was used to compare the results of E-cadherin and Cox-2 expression. P values of ≤ 0.05 were considered significant.

3. Results

3.1 Effect of IP6 on the histology and morphometry of jejunal explants exposed to DON and FB1 mycotoxins

After 3 hours of incubation with DON or FB1, the explants exhibited moderate to severe jejunal lesions. The main histological changes observed included multifocal to diffuse atrophy and villi fusion, the lack of apical epithelium, necrotic debris, cell vacuolation and the flattening of enterocytes (Fig. 1). Histological scores decreased significantly in the explants exposed to DON (31.4%) and FB1 (23%) compared with the control group. On the other hand, when the explants were pre-treated with 2.5 mM and 5 mM of IP6, the histological scores exhibited a significant increase ($p \leq 0.05$) compared with explants exposed to mycotoxins alone (Fig. 1). Explants submitted to 2.5 mM IP6 exhibited an increase of 30.8% and 23.8% after DON and FB1 treatment, respectively, whereas 5 mM of IP6 induced an increase of 38.3% and 24.6% in histological score in explants exposed to DON and FB1, respectively.

Explants exposed to DON exhibited a significant decrease (50%) in villi height compared with the control. However, explants treated with 2.5 mM or 5 mM of IP6 exhibited a significant increase in villi height (70.2% and 71.8%, respectively) compared with explants exposed to DON (Fig. 1). Explants incubated with FB1 exhibited a significant decrease in villi height (35%) compared with the control group, whereas pre-treatment with 2.5 mM or 5

mM of IP6 promoted an increase of 54.5% ($p \leq 0.05$) and 45.5% ($p \geq 0.05$) in villi height, respectively.

Goblet cell density was estimated by counting the number of goblet cells per villi. The mean number of goblet cells was 4, 3.4 and 3.8 for the control, DON and FB1 explants, respectively. Treatments with 2.5 and 5 mM of IP6 induced no significant changes in goblet cell density compared with explants treated with DON and FB1 alone (data not shown).

3.2 Effect of IP6 on cell proliferation and apoptosis in jejunal explants exposed to DON and FB1 mycotoxins

Cell proliferation and apoptosis were assessed using an immunohistochemical assay to detect Ki-67 and cleaved caspase-3, respectively. Explants exposed to DON and FB1 exhibited no significant change in cell proliferation compared with the control group. However, explants previously treated with 2.5 mM and 5 mM of IP6 exhibited a significant decrease (17.5% and 28.6%, respectively) in Ki-67 expression compared with the explants exposed to DON (Fig. 2). Moreover, IP6 treatment also induced a significant decrease in cell proliferation compared with explants exposed to FB1 alone (22% and 30% for 2.5 and 5 mM of IP6, respectively).

A significant increase in caspase-3 expression was observed in explants exposed to DON (83%) and FB1 (47%) compared with the control group. Nonetheless, when explants were exposed to DON plus 5 mM IP6, a significant decrease (43.7%) in cell apoptosis was observed compared with the DON group. Explants exposed to 2.5 mM IP6 plus DON exhibited no changes in caspase-3 expression compared with the DON group. No significant change in caspase-3 expression was observed when the explants were treated with IP6 plus FB1 compared with the FB1 group (Fig. 2).

The expression of p53 was assessed to evaluate the relationship of p53 with apoptosis

induction. No immunostaining was observed in control explants or explants exposed to mycotoxins alone or with IP6 treatments.

3.3 Effect of IP6 on the expression of junction proteins and cyclooxygenase-2 on jejunal explants exposed to DON and FB1 mycotoxins

Explants exposed to DON alone exhibited a significant increase (71.3%) in Cox-2 expression compared with the control. However, in explants treated with IP6 (5 mM) plus DON, we observed a significant decrease (48%) in Cox-2 expression in comparison with the DON group. Exposure to FB1 alone or in addition to IP6 induced no significant change in Cox-2 immunoexpression in the explants (Fig. 3).

The expression of E-cadherin was assessed to evaluate adherens junction integrity. Explants exposed to DON and FB1 alone or with the addition of IP6 exhibited no significant changes in E-cadherin expression (Fig. 3). Oxidative stress was evaluated by the immunoexpression of Cox-2.

4. Discussion

Phytic acid is a potent natural antioxidant component of cereal diets that can modulate inflammatory and carcinogenic diseases (Kamp et al., 1995; Vucenik, Shamsuddin, 2006). Most studies on phytic acid thus far have focused on the antineoplastic effects of IP6, whereas the effects on inflammation are unknown, and the mechanisms of anti-inflammatory action remain poorly understood.

The effects of IP6 on inflammatory diseases have been associated with the inhibition of ROS production, the increase in TGF- β (transforming growth factor-beta) gene expression, the decrease in TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) transcription and the modulation of proinflammatory cytokine secretion in the intestinal epithelium (Cholewa et al., 2008; Kapral et al., 2013). There is increasing evidence that the intestinal tissue is a target for

deoxynivalenol (Bracarense et al., 2012) and fumonisin B1 (Grenier et al., 2013). Efforts to alleviate the toxic effects of mycotoxins have been an area of research interest for our group (Grenier et al., 2012). In the present study, we present evidence that phytic acid promotes a protective effect on jejunal explants exposed to *Fusarium* mycotoxins.

The main histological changes observed in jejunal explants exposed to DON and FB1 alone included atrophy and fusion of the villi, loss of apical enterocytes, necrotic debris and changes in enterocytes morphology. Similar lesions were observed in previous studies with *in vivo* and *ex vivo* exposure to DON and FB1 (Kolf-Clauw et al., 2009; Bracarense et al., 2012). In this study, we observed a protective effect of IP6. This effect could be evaluated by an increase in the histological score and the villi height in explants exposed to IP6. In a previous experiment, we observed that doses of 2.5 mM and 5 mM IP6 improved the intestinal morphology and villi height of jejunal explants submitted to hypoxia (data not published). IP6 likely acts on intestinal morphology by inhibiting the ribotoxic stress and lipid peroxidation caused by DON and FB1, respectively, through its antioxidant action. Moreover, the increase in intracellular IP6 may promote cellular differentiation and morphology preservation through the modulation of apoptosis and proliferation signal transduction, as observed in colon cancer studies (Challa et al., 1997; Jenab, Thompson, 2000). In the present study, no significant change in goblet cell density was observed in explants submitted to the different treatments. In *in vivo* studies, pigs fed diets with FB1 and DON exhibited significant changes in goblet cells density (Bracarense et al., 2012; Piva et al., 2005). The difference in these results is likely related to the short period of exposure to mycotoxins (three hours) in this *ex vivo* model. The interactions between IP6 and intestinal mucin production remain to be investigated.

Studies *in vitro* and *in vivo* exhibited contradictory results with respect to the proliferation of intestinal cells after DON (Bracarense et al., 2012; Diesing et al., 2011; Van

De Walle et al., 2010) and FB1 (Bracarense et al., 2012; Theumer et al., 2002;) exposure. In this experiment, the explants exposed to DON and FB1 alone exhibited proliferative cell indexes similar to control explants. Interestingly, the combination of 5 mM IP6 plus the mycotoxins promoted a significant decrease of 28% and 30% in cell proliferation compared with DON and FB1 mycotoxin treatment alone, respectively. Phytic acid can decrease cell proliferation by binding to the insulin-like growth factor II (IGF-II) receptor, decreasing DNA synthesis and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and blocking ERK 1/2 signaling to arrest the cells in the G1 phase of the cell proliferation cycle (Shamsuddin, 1999). However, no data concerning the interaction between IP6 and Ki-67 expression in cell proliferation are available. We hypothesized that similar to the action reported on PCNA, IP6 inhibits the expression of Ki-67, leading to cell quiescence.

In the present study, cell apoptosis was evaluated by the positive immunoexpression of Ccasp3. In the crypt region, we observed an increase of 83% and 47% in caspase-3 expression in explants exposed to DON and FB1, respectively. Such changes reflected on the decrease in villi height in explants exposed to DON and FB1. It has been established that DON activates p38 MAPKs through a ribotoxic stress response and the generation of reactive oxygen species (ROS), inducing cell apoptosis (Lucioli et al., 2013; Pestka, 2008; Yang et al., 2000). In this apoptotic pathway, Ccasp3 is activated, and mutation of the p53 gene may also occur (Pestka, 2008). The mechanisms for apoptosis induction by FB1 are unclear but likely involve the disruption of many regulatory cell pathways, including the inhibition of protein kinase C and the activation of MAPKs and Ccasp3 due the intracellular accumulation of sphingolipids and consequent lipid peroxidation (Desai et al., 2002; Gopee et al., 2003). In an *in vitro* study with cancer cells, IP6 decreased the activated levels of ERK1/2, JNK1/2 and p38 and induced apoptosis together with a decrease in cell proliferation (Gu et al., 2010). However, phytic acid has the ability to modulate apoptosis through prevention or induction to protect the cells and

prevent diseases (Vucenik, Shamsuddin, 2006). In this experiment, 5 mM IP6 was able to significantly reduce the cell apoptosis induced by DON. We hypothesize that IP6 modulated the decrease in cell apoptosis by inhibiting the activation of MAPKs induced by the oxidative stress caused by mycotoxins. We observed no significant p53 expression in the explants exposed to DON and FB1. It is likely that in this experiment, the short exposure time, even at high doses of mycotoxin, was not sufficient to induce apoptosis linked to activation of the p53 gene. Taken together, these results indicate that DON and FB1 induce apoptosis via the caspase-3 pathway.

In addition to triggering the activation of MAPKs, both DON (Diesing et al., 2011; Pestka, 2008; Pinton et al., 2010) and FB1 (Bouhet et al., 2004; Bracarense et al., 2012; Meli et al., 2000) can decrease cellular adhesion and transepithelial electrical resistance (TEER) as well as increase Cox-2 expression, mainly by upregulation of TNF- α . Furthermore, the decrease of cellular adhesion and the upregulation of Cox-2 expression have been related to ROS production and MAPK activation (Huet et al., 2013; Kim et al., 2013; Sánchez-Fidalgo et al., 2013; Wang et al., 1998). In the present study, no significant changes in E-cadherin expression were observed in any of the treatments. However, when the explants were exposed to 5 mM IP6, the E-cadherin expression improved 28% and 9% compared with the DON and FB1 groups, respectively. It is likely that, the short period of incubation with the mycotoxins was insufficient to induce a significant change in the E-cadherin expression. We believe that longer periods of IP6 exposure could confer higher protection against the injuries caused by mycotoxins on cell adhesion proteins.

The expression of Cox-2 has increased 71% in explants exposed to DON compared with the control, whereas the incubation with 5 mM IP6 plus DON induced a decrease of 48%. Similar effects were observed in explants incubated with FB1 and IP6 (5 mM) plus FB1, although the differences were not significant. There are few reports of the effects of DON

and FB1 on Cox-2 expression (Krishnaswamy et al., 2010; Meli et al., 2000). The decrease of Cox-2 expression and TNF- α transcription has been reported in *in vivo* (Saad et al., 2013) and *in vitro* (Cholewa et al., 2008; Parfiniewicz et al., 2012) IP6 exposure in colon inflammatory disease and cancer. Similarly, we observed a significant reduction in Cox-2 expression when we compared explants exposed to DON with explants treated with IP6. It is well established that DON induces the direct production of ROS by a ribotoxic stress pathway (Pestka, 2008; Yang et al., 2000). The production of ROS leads to the expression of Cox-2, an enzyme that plays an important role in inflammatory reactions (Korbecki et al., 2013). Phytic acid binds to the coordination sites for iron, preventing the redox activation necessary to catalyze OH formation by a Fenton reaction (Kamp et al., 1995). Therefore, we hypothesize that the decrease in Cox-2 expression observed in this study was associated with the ability of IP6 to inhibit ROS production. Fumonisin induced no significant changes in Cox-2 expression. ROS production induced by FB1 occurs indirectly via the intracellular accumulation of sphingolipids (Desai et al., 2002; Gopee et al., 2003). We believe that the short period of incubation with the FB1 mycotoxin was not sufficient to promote an accumulation of sphingolipids that induced a significant increase in the Cox-2 expression.

In conclusion, the present study demonstrated that phytic acid decrease the toxic effects induced by DON and FB1 on intestinal tissue. The protective effects were demonstrated by immunohistological and morphometrical assays. Thus, ingestion of phytic acid could contribute to the maintenance of intestinal homeostasis, the absorption of nutrients and the defense against toxic agents.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from CNPq (474691/2012-8) and Fundação Araucária, Brazil.

References

- Abu El Saad, A.S., Mahmoud, H.M., 2009. Phytic Acid exposure alters aflatoxin B1-induced reproductive and oxidative toxicity in albino rats (*Rattus norvegicus*). Evid. Based Complement. Altern. Med. 6, 331-341.
- Anekonda, T.S., Wadsworth, T.L., Sabin, R., Frahler, K., Harris, C., Petriko, B., Ralle, M., Woltjer, R., Quinn, J.F., 2011. Phytic acid as a potential treatment for Alzheimer's pathology: evidence from animal and *in vitro* models. J. Alzheimers Dis. 23, 21-35.
- Binder, E.M., Tan, L.M., Chin, L.J., Handl, J., Richard, J., 2007. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feed and feed ingredients. Anim. Feed Sci. Technol. 137, 265-282.
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E., Oswald, I.P., 2004. The mycotoxin Fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. Toxicol. Sci. 77, 165-171.
- Bouhet, S., Oswald, I.P., 2005. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. Vet. Immunol. Immunopathol. 108, 199-209.
- Bouhet, S., Le Dorze, E., Peres, S., Fairbrother, J.M., Oswald, I.P., 2006. Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies. Food and Chem. Toxicol. 44, 1768-1773.
- Bracarense, A-P. F.L., Lucioli, J., Grenier, B., Pacheco, G.D., Moll, W-D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2012. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction induces morphological and immunological changes in the intestine of piglets. Br. J. Nutr. 10, 1776-1786.
- Challa, A., Rao, D.R., Reddy, B., 1997. Interactive suppression of aberrant crypt foci induced by azoxymethene in rat colon by phytic acid and green tea. Carcinogenesis 18, 2023-2026.

- Chen, C.Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z., Kacin, M., 1998. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the C-Jun NHZ-terminal kinase. *Sci.* 280, 1945-1949.
- Cholewa, K., Parfiniewicz, B., Berdnarek, I., Swiatkowska, L., Jezienicka, E., Kierot, J., Weglarz, L., 2008. The influence of phytic acid on TNF-alpha and its receptor genes expression in colon cancer Caco-2 cells. *Acta Pol. Pharm.* 65, 75-79.
- Desai, K., Sullards, M.C., Allegod, J., Wang, E., Schmelmz, E.M., Hartl, M., Humpf, H-U., Liotta, D.C., Peng, Q., Merrill Jr, A.H., 2002. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Bioch. Bioph. Acta.* 1585, 188-192.
- Diesing, A-K., Nossol, C., Danicke, S., Walk, N., Post, A., Kahlert, S., Rothkotter, H-J., Kluess, J., 2011. Vulnerability of polarized intestinal porcine epithelial cells to mycotoxin deoxynivalenol depends on the route of application. *Plos One*, 6, e17472.
- Gelderblom, W.C.A., Abel, S., Smuts, C.M., Marnewick, J., Marasas, W.F.O., Lemmer, E.R., Ramljak, D., 2001. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environ. Health Perspect.* 109 (suppl. 2), 291-300.
- Gelineau-van Waes, J, Rainey. M.A., Maddox, J.R., Voss, K.A., Sachs, A.J., Gardner, N.M., Wilberding, J.D., Riley, R.T., 2012. Increase sphingoid base-1-phosphates and failure of neural tube closure after exposure to Fumonisin or FTY720. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 94, 790-803.
- Gopee, N.V., He, Q., Sharma, R.P., 2003. Fumonisin B1 induced apoptosis is associated with delayed inhibition of protein kinase C, nuclear factor κ B and tumor necrosis factor α in LLC-PK1 cells. *Chem. Biol. Inter.* 146, 131-145.
- Graf, E., Eaton, J.W., 1985. Dietary suppression of colonic cancer. Fiber or phytate? *Cancer* 56, 717-718.
- Graf, E., Eaton, J.W., 1990. Antioxidant functions of phytic acid. *Free Rad. Biol. Med.* 8, 61-69.

- Grases, F., Garcia-Ferragut, L., Costa-Bauzá, A., March, J.G., 1996. Study of the effects of different substances on the early stages of papillary stone formation. *Nephron*. 73, 561-568.
- Grases, F., Sanchis, P., Perello, J., Isern, B., Prieto, R.M., Fernandez-Palomeque, C., Fiol, M., Bonnin, O., Torres, J.J., 2006. Phytate (myo-inositol hexakisphosphate) inhibits cardiovascular calcifications in rats. *Front. Biosci.* 11, 136-142
- Grenier, B., Bracarense, A.P. F. L., Schwartz, H. E., Trumel, C., Cossalter, A. M., Schatzmayr, G., Kolf-Clauw, M., Moll, W. D., Oswald, I. P., 2012. The low intestinal and hepatic toxicity of hydrolyzed fumonisin B₁ correlates with its inability to alter the metabolism of sphingolipids. *Biochem. Pharmacol.* 83, 1465-1473.
- Grenier, B., Bracarense, A.P., Schwartz, H.E., Lucioli, J., Cossalter, A.M., Moll, W.D., Schatzmayr, G., Oswald, I.P., 2013. Biotransformation approaches to alleviate the effects induced by *Fusarium* mycotoxins in swine. *J. Agric. Food Chem.* 61, 6711-6719.
- Gu, M., Raina, K., Agarwal, R., 2009. Inositol hexaphosphate down-regulates constitutive and ligand-induced mitogenic and cell survival signaling, and causes caspase-mediated apoptotic death of human prostate carcinoma PC-3 cells. *Mol. Carcinog.* 49, 1-12.
- Gumprecht, L.A., Beasley, V.R., Weigel, R.M., Parker, H.M., Tumbleson, M.E., Bacon, C.W., Meredith, F.I., Haschek, W.M., 1998. Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. *Toxicol. Pathol.* 26, 777-788.
- Huet, O., Laemmel, E., Fu, Y., Dupic, L., Aprico, A., Andrews, K.L., Moore, S.L., Harrois, A., Meikle, P.L., Vicaut, E., Chin-Dusting, J.P., Duranteau, J., 2013. Interleukin 10 antioxidant effect decreases leukocytes/endothelial interaction induced by tumor necrosis factor α . *Shock* 39, 83-88.
- Kamp, D.W., Israbian, V.A., Yeldandi, A.V., Panos, R.J., Graceffa, P., Weitzman, S.A., 1995. Instillation of Asbestos Phytic Acid, an Iron Chelator, Attenuates Pulmonary Inflammation

and Fibrosis in Rats after Intratracheal instillation of asbestos. *Toxicol. Pathol.* 23, 689-695.

Kapral, M., Wawszyk, J., Jurzak, M., Hollek, A., Weglarz, L., 2012. The effect of inositol hexaphosphate on the expression of selected metalloproteinase and their tissue inhibitors in IL-1 β -stimulated colon. *Int. J. Colorectal Dis.* 27, 1419-1428.

Kapral, M., Wawszczyk, J., Hollek, A., Weglarz, L., 2013. Induction of the expression of genes encoding TGF-beta isoforms and their receptors by inositol hexaphosphate in human colon cancer cells. *Acta Pol. Pharm.* 70, 357-363.

Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A., Cawood, M.E., Coetzer, J.A.W., 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of Fumonisin B1. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 57, 269-275.

Khatiwada, J., Verghese, M., Davis, S., Williams, L.L., 2011. Green tea, phytic acid, and inositol in combination reduced the incidence of azoxymethane-induced colon tumor in fisher 344 male rats. *J. Med. Food* 14, 1313-1320.

Kim, H., Bae, S., Kim, Y., Cho, C.H., Kim, S.J., Kim, Y.J., Lee, S.P., Kim, H.R., Hwang, Y.I., Kang, J.S., Lee, W.J., 2013. Vitamin C prevents stress-induced damage on the heart caused by the death of cardiomyocytes, through down-regulation of the excessive production of catecholamine, TNF- α , and ROS production in Gulo (-/-) Vit C-insufficient mice. *Free Radic. Biol. Med.* 65C, 573-583.

Kolf-Clauw, M., Castellote, J., Joly, B., Bourges-Abella, N., Raymond-Letron, I., Pinton, P., Oswald, I.P., 2009. Development of pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis. *Toxicol. In Vitro* 23, 1580-1584.

Korbecki, J., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Chlubek, D., 2013. The effect of reactive oxygen species on the synthesis of prostanoids from arachidonic acid. *J. Physiol. Pharmacol.* 64, 409-421.

- Krishnaswamy, R., Devaray, S.N., Padma, V.V., 2010. Lutein protects HT-29 cells against deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis: prevention of NF-kappa B nuclear localization and down regulation of NF-kappa B and cyclo-oxygenase-2 expression. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 50-60.
- Kulawik, P., Ozogul, F., Glew, R., Ozogul, Y., 2013. Significance of antioxidants for seafood safety and human health: A review. *J. Agric. Food Chem.* 61, 475-491.
- Lee, H.J., Lee, S.A., Choi, H., 2005. Dietary administration of inositol and/or inositol-6-phosphate prevents chemically-induced rat hepatocarcinogenesis. *Asian Pac. J. Cancer* 6, 41-47.
- Lolas, G.M., Palamidis, N., Markakis, P., 1976. The phytic acid-total phosphorus relation in barley, oats, soybeans and wheat. *Cereal Chem.* 53, 867-871.
- Lucioli, J., Pinton, P., Patrick, C., Laffitte, J., Grosjean, F., Kolf-Clauw, M., Oswald, I.P., Baracarene, A.P.F.R.L., 2013. The food contaminant deoxynivalenol activates the mitogen activated protein kinases in the intestine: interest of ex vivo models as an alternative to in vivo experiments. *Toxicon* 66, 31-36, 2013.
- Meli, R., Ferrante, M.C., Raso, G.M., Cavaliere, M., Di Carlo, R., Lucisano, A., 2000. Effect of Fumonisin B1 on inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in LPS-stimulated J774A.1 cells. *Life Sci.* 67, 2845-2853.
- Merril Jr, A.H., Van Echten, G., Wang, E., Sandhoff, K., 1993. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N- acyltransferase and *de novo* sphingolipids biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 268, 27299-27305.
- Onomi, S., Okazaki, Y., Katayama, T., 2004. Effect of dietary level of phytic acid on hepatic and serum lipid status in rats fed a high-sucrose diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1379-1381.
- Pacheco, G.D., Silva, C.A., Pinton, P., Oswald, I.P., Bracarene, A.P.F.R.L., 2012. Phytic

- acid protects porcine intestinal epithelial cells from deoxynivalenol (DON) cytotoxicity. *Exp. Toxicol. Pathol.* 64, 345-347.
- Parfiniewicz, B., Pendzich, J., Kapral, M., Bednarek, I., Weglarz, L., 2012. The influence of TNF-alpha on concentration of soluble adhesion molecules in cultures of HT-29 cells exposed to inositol hexaphosphate. *Acta Pol. Pharm.* 6, 1291-1297.
- Pestka, J.J., Smolinski, A.T., 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit.* 8, 39-69.
- Pestka, J.J., 2008. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* 25, 1128-1140.
- Pinton, P., Braicu, C., Nougayrede, J-P., Laffitte, J., Taranu, I., Oswald, I.P., 2010. Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression. Of claudin-4 through a mitogen activated protein kinase-dependent mechanism. *J. Nutr.* 140, 1956-1962.
- Piva, A., Casadei, G., Pagliuca, G., 2005. Activated carbon does not prevent the toxicity of culture material containing Fumonisin B1 when fed to weanling piglets. *J. Anim. Sci.* 83, 1939-1947.
- Randall, K.J., Turton, J., Foster, J.R., 2011. Explant culture of gastrointestinal tissue: a review of methods and applications. *Cell Biol. Toxicol.* 27, 267-284.
- Rodrigues, I., Naehrer, K., 2012. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxin in feedstuffs and feed. *Toxins* 4, 663-675.
- Saad, N., Esa, N.M., Ithnin, H., 2013. Suppression of β -catenin and Cyclooxygenase-2 expression and Cell proliferation in Azoxymethane-induced colonic cancer in rats by rice bran phytic acid (PA). *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 3093-3099.
- Sánchez-Fidalgo, S., da Silva, M.S., Cárdeno, A., Aparicio-Soto, M., Frankland-Sawaya, A.C., Souza-Brito, A.R., de Ia Lastra, C.A., 2013. *Abarema cochliacarpus* reduces LPS-

induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages regulating ROS-MAPK signal pathway. *J. Ethnopharmacol.* 149, 140-147.

Shamsuddin, A.M., Vucenik, I., 2005. Ip6 and inositol in cancer prevention and therapy. *Curr. Cancer Ther. Res.* 1, 259-269.

Shamsuddin, A.M., 1999. Metabolism and cellular functions of IP6: a review. *Anticancer Res.* 19, 3733-3736.

Soriano, J.M., González, L., Catalá, A.I., 2005. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of Fumonisin B1. *Prog. Lip. Res.* 44, 345-356.

Tantivejkul, K., Vucenik, I., Shamsuddin, A.M., 2003. Inositol hexaphosphate (IP6) inhibits key events of cancer metastasis: I. In vitro studies of adhesion, migration and invasion of MDA-MB 231 human breast cancer cells. *Anticancer Res.* 23, 3671-3680.

Theumer, M.G., Lopez, A.G., Chulze, S.N., Rubinstein, H.R., 2002. Immunobiological effects of Fumonisin B1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 149-155.

Ueno, Y., 1984. Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 4, S124-S132.

Ueno, Y., Iijima, K., Wang, S-D., Sugiura, Y., Sekijima, M., Tanaka, T., Chen, C., Yu, S-Z., 1997. Fumonisin as a possible contributory risk factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China by HPLC and ELISA. *Food Chem. Toxicol.* 35, 1143-1150.

Van De Walle, J., Sergent, T., Piront, N., Toussaint, O., Schneider, Y-J., Larondelle, Y., 2010. Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 291-298.

Voss, K.A., Riley, R.T., Norred, W.P., Bacon, C.W., Filmore, I.M., Howard, P.C., Plattner, R.D., Collins, T.F.X., Hansen, D.K., Porter, J.K., 2001. An overview of rodent toxicities: liver

and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*. Environ. Health Perspect. 109 (suppl. 2), 259-266.

Vucenik, I., Podezasy, J.J., Shamsuddin, A.M. 1999. Antiplatelet activity of inositol hexaphosphate (IP6). Anticancer 19, 3689-3693.

Vucenik, I., Shamsuddin, A.M., 2006. Protection against cancer by dietary IP6 and Inositol. Nutr. Cancer 55, 109-125.

Wang, X., Martindale, J.L., Liu, Y., Holbrook, N.J., 1998. The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signaling pathways on cell survival. Biochem. J. 333, 291-300.

Wang, H., Wei, H., Ma, J., Luo, X., 2000. The Fumonisin B1 content in corn from North China, a high-risk area of esophageal cancer. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 19, 139-141.

Yang, G-H., Jarvis, B.B., Chung, Y-J., Pestka, J.J., 2000. Apoptosis induction by the Satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 164, 149-160.

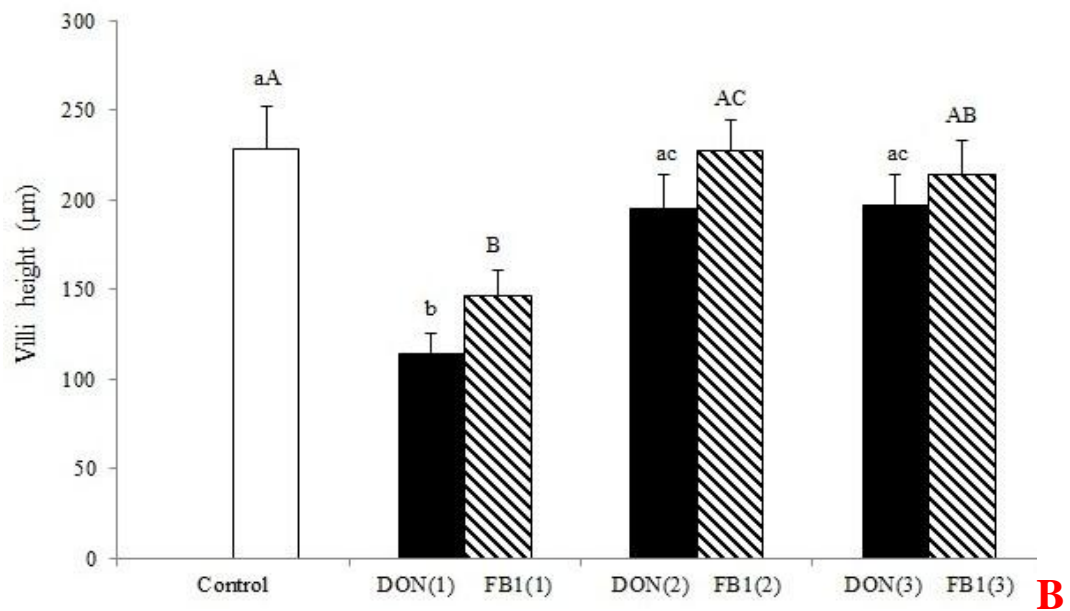
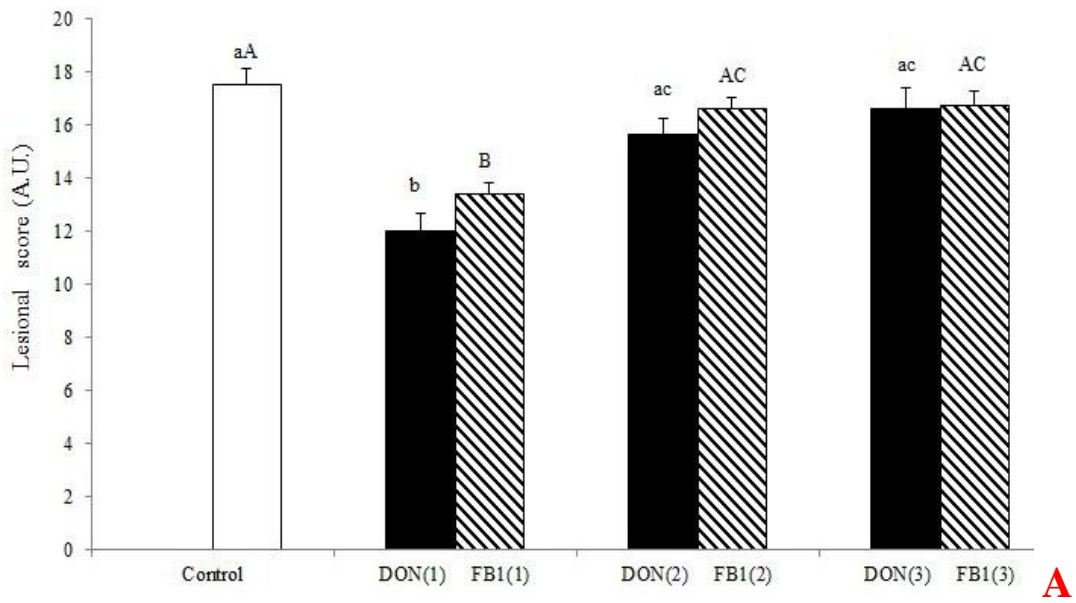
Zhou, H.R., Islam, Z., Pestka, J.J. 2003. Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression. In spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin. Toxicol. Sci. 72, 130-142.

Table 1. Histological criteria score used to establish the jejunal lesional score*

Type of lesion	Severity score	Maximal total score
Villi atrophy	0-2	22
Villi fusion	0-2	
Interstitial edema	0-2	
Lymphatic vessel dilation	0-2	
Loss of apical enterocytes	0-2	
Cell vacuolation	0-2	
Necrotic debris	0-2	
Microvilli homogeneity	0-2	
Enterocytes morphology [#]	0-3	
Number of villi [•]	0-3	

* The jejunal score of each treatment was obtained by the sum of each lesion score. The severity score was determined as: 0-diffuse; 1-local; 2-absent; # Columnar epithelium (3); cuboid epithelium (2); flattened epithelium (1); no epithelium (0).

• > 25 villi/explant (3); 15-25 villi (2); < 15 villi (1) and no villi (0).



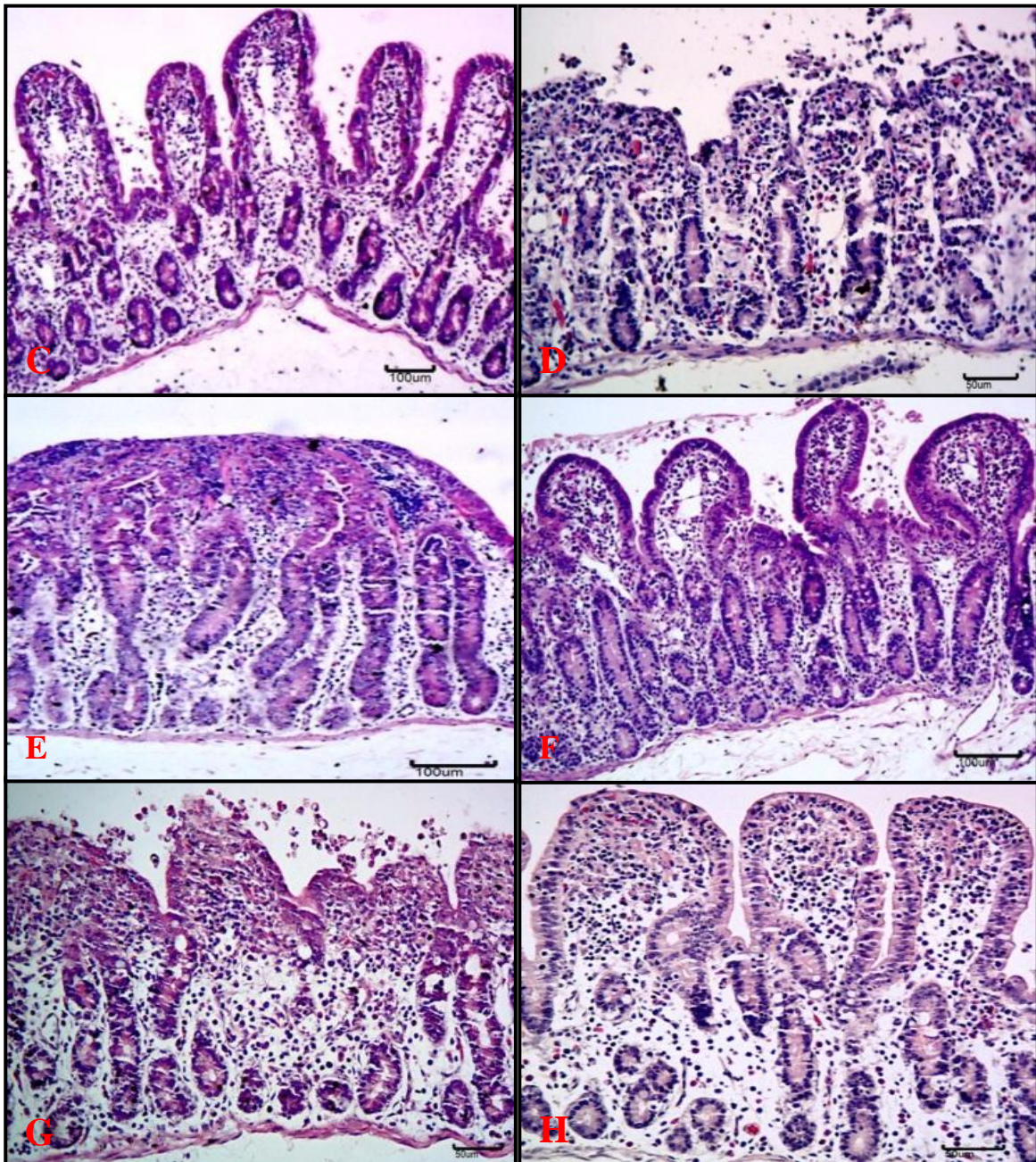
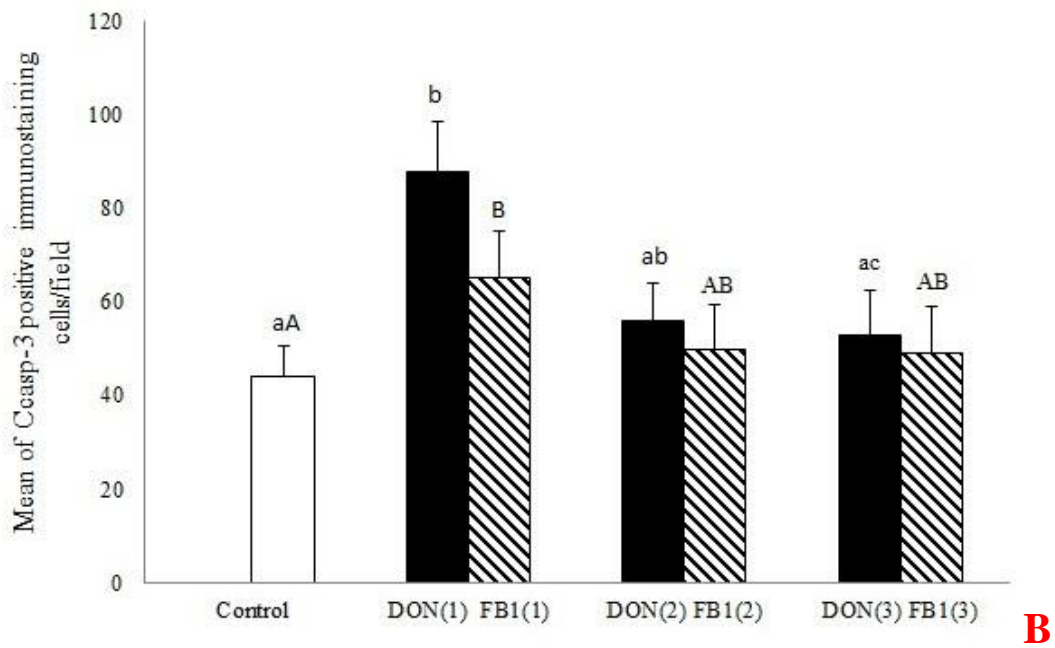
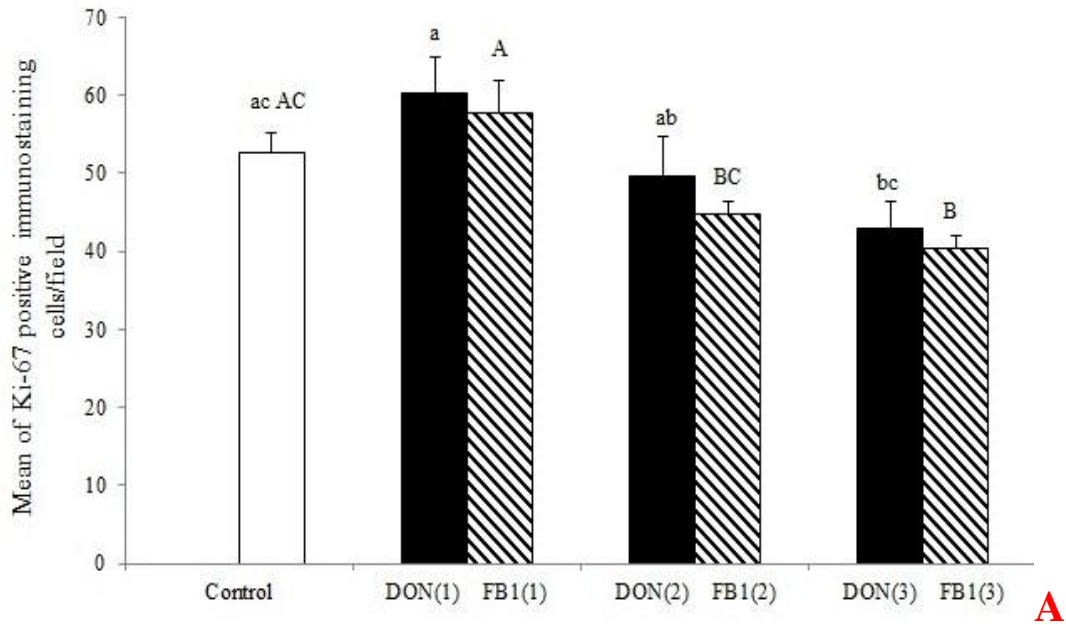


Figure 1. The effect of IP6 on the histological morphology of jejunum explants exposed to DON and FB1. **DON(1)**-DON alone; **DON(2)**- DON plus 2.5 mM IP6; **DON(3)**-DON plus 5 mM IP6; **FB1(1)**-FB1 alone; **FB1(2)**-FB1 plus 2.5 mM IP6; **FB1(3)**-FB1 plus 5 mM IP6. **A-** The effect of IP6 on the lesional score of jejunum explants exposed to DON and FB1 (Arbitrary Units). **B-** The effect of IP6 on the villi height of jejunum explants exposed to DON and FB1 (μm). Mean values with unlike letters were significantly different ($p \leq 0.05$). **C-** Control treatment. H&E, bar 100 μm . **D-** DON group, villi atrophy and loss of the apical enterocytes. H&E, bar 100 μm . **E-** DON group, severe villi fusion. H&E, bar 100 μm . **F-**

DON plus 5 mM IP6. H&E, bar 100 μ m. **G**- FB1 group, villi atrophy, fusion and loss of the apical enterocytes. H&E, bar 50 μ m. **H**- FB1 plus 5 mM IP6. H&E, bar 50 μ m.



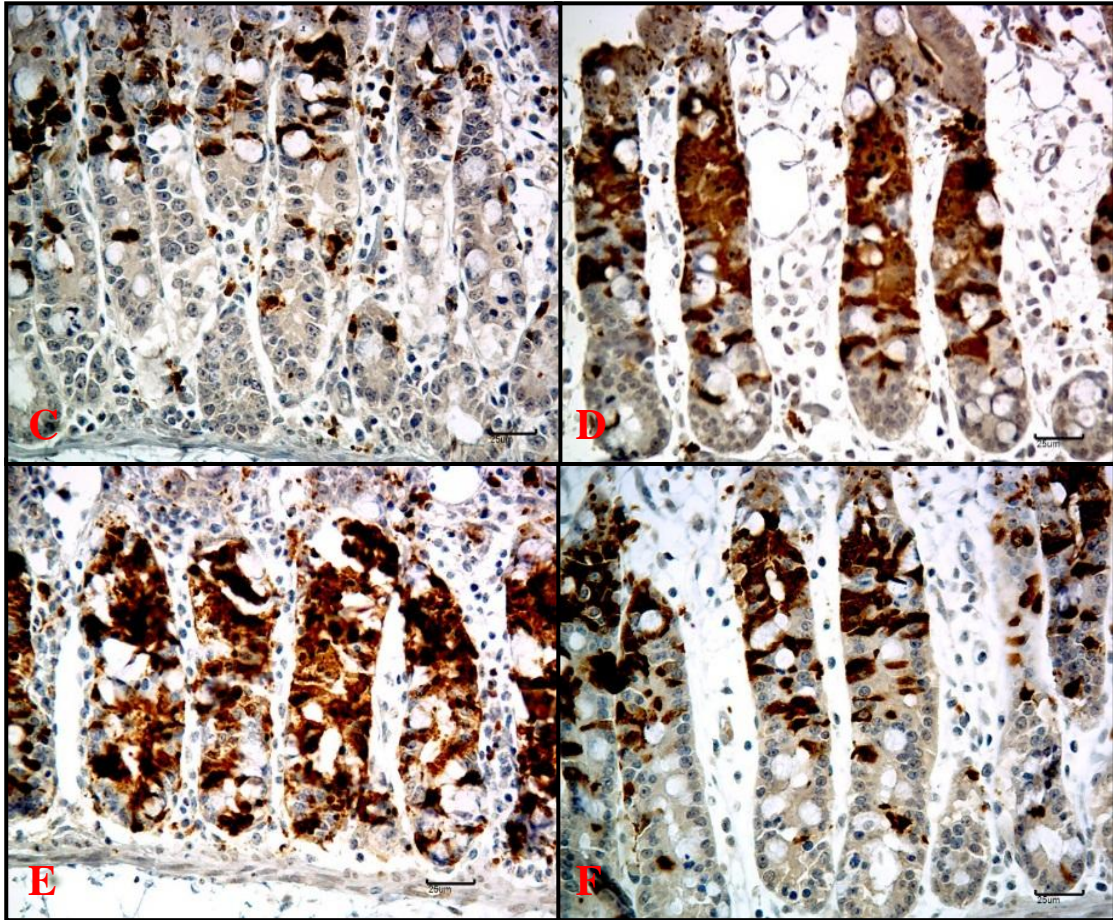
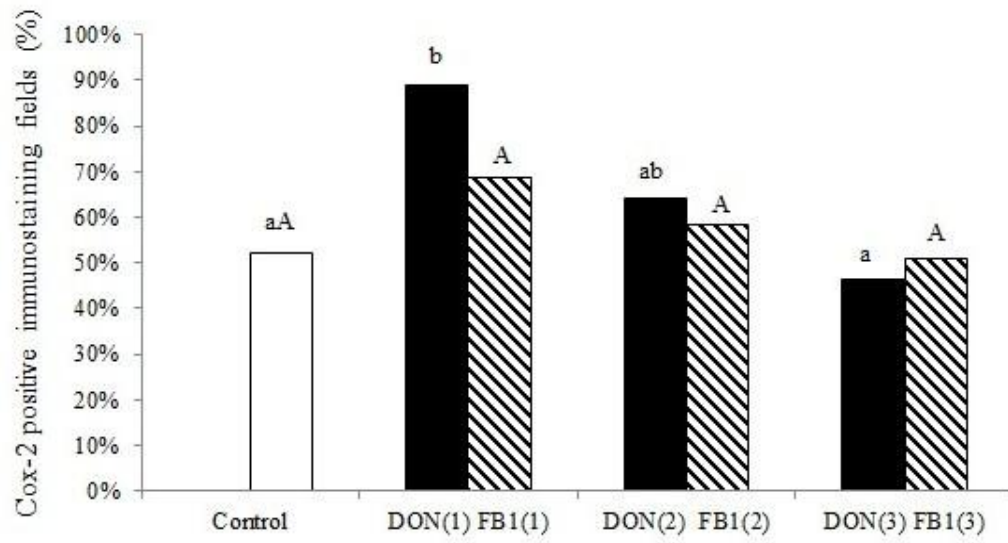
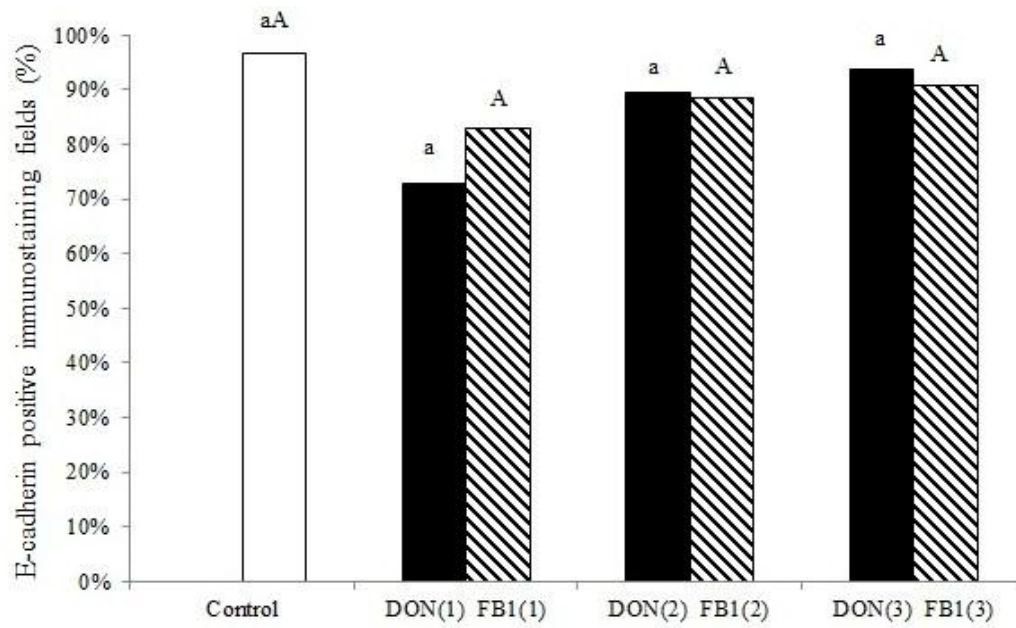


Figure 2. The effect of IP6 on the cell proliferation and apoptosis of jejunum explants exposed to DON and FB1 and immunohistochemistry exam for Ccasp3 with cytoplasmic immunostaining (dark brown). **DON(1)**-DON alone; **DON(2)**- DON plus 2.5 mMIP6; **DON(3)**-DON plus 5 mM IP6; **FB1(1)**-FB1 alone; **FB1(2)**-FB1 plus 2.5 mM IP6; **FB1(3)**-FB1 plus 5 mM IP6. **A-** The effect of IP6 on Ki-67 expression of jejunum explants exposed to DON and FB1. **B-** The effect of IP6 on caspase-3 expression of jejunum explants exposed to DON and FB1 (μm); Mean values with unlike letters were significantly different ($p \leq 0.05$). **C-** Control treatment. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **D-** FB1 alone group. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **E-** DON alone group. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **F-** DON plus 5 mM IP6. Immunoperoxidase method, bar 25 μm .

**A****B**

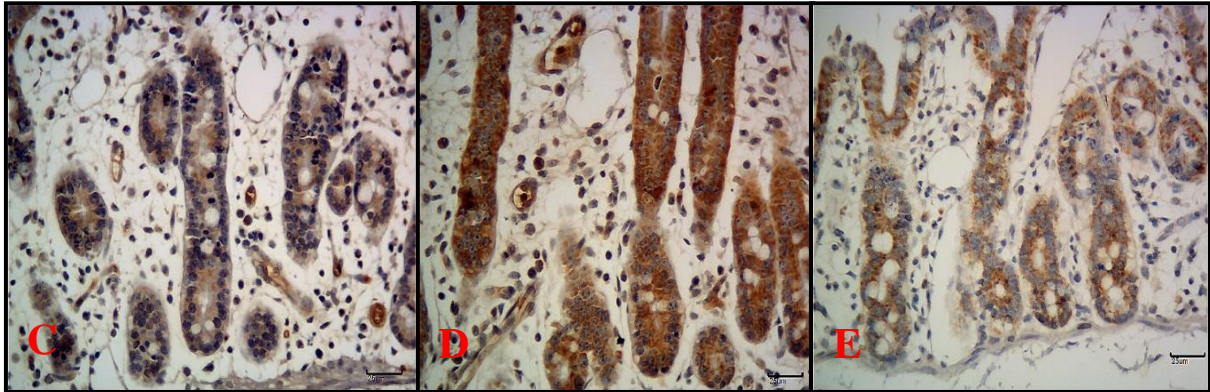


Figure 3. The effect of IP6 on cyclooxygenase and cell adhesion protein expression in jejenum explants exposed to DON and FB1 (percentage) and immunohistochemistry exam for Cox-2 with cytoplasmic immunostaining (dark brown/arrows). **DON(1)**-DON alone; **DON(2)**- DON plus 2.5 mM IP6; **DON(3)**-DON plus 5 mM IP6; **FB1(1)**-FB1 alone; **FB1(2)**-FB1 plus 2.5 mM IP6; **FB1(3)**-FB1 plus 5 mM IP6. **A-** The effect of IP6 on the Cox-2 expression in jejenum explants exposed to DON and FB1. **B-** The effect of IP6 on E-cadherin expression in jejenum explants exposed to DON and FB1 (μm). Percentage values with unlike letters were significantly different ($p \leq 0.05$). **C-** Control treatment. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **D-** DON alone group. Immunoperoxidase method, bar 25 μm . **E-** DON group plus 5 mM IP6. Immunoperoxidase method, bar 25 μm .

CONCLUSÕES

- Explantes jejunais expostos às doses de 2,5 mM e 5 mM de IP6 mostraram maior preservação da morfologia intestinal histológica e altura de vilosidades. Além disso, o IP6 reduziu a proliferação celular, a apoptose e a expressão de Cox-2.
- A presença de IP6 diminuiu as alterações morfológicas, a proliferação celular, a apoptose e a expressão de Cox-2 nos explantes jejunais expostos às micotoxinas desoxinivalenol e fumonisina B1.

APÊNDICE A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 123/12

Londrina, 10 de maio de 2012

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UUEL, reunido em 8 de maio de 2012, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Efeitos do ácido fítico sobre explantes intestinais de suínos expostos a fusariotoxinas", registrado sob processo nº CEUA 8022.2012.40, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos solicitados o projeto foi julgado *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 9 suínos de raça Landrace/L White com idade de 4 a 5 semanas. Neste projeto será avaliado o efeito do ácido fítico sobre explantes intestinais de suínos expostos a micotoxinas deoxinivalenol e fumonisina B1 a fim de verificar seu efeito protetor sobre a mucosa intestinal exposta as micotoxinas. Após abate, amostras de 5 cm do jejuno serão coletados dos suínos e colocados em meio de Williams E, e lavados até remoção do conteúdo intestinal. Posteriormente, os fragmentos serão abertos e serão feitos os explantes. Os explantes serão pré-tratados com ácido fítico e expostos a deoxinivalenol e fumonisina. Após a exposição o intestino será fixado para processamento histológico e análise das alterações e do efeito protetor do ácido fítico no intestino. Também será realizada a análise imunohistoquímica para expressão da proteína de junção celular E-caderina. Os experimentos estão previstos para serem desenvolvidos em 22 meses após sua aprovação na CEUA-UUEL.

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

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Waldiceu Ap. Verri Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Coordenador da CEUA/UUEL

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Ana Paula Frederico R. L. Bracarense
Coordenadora do Projeto
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Centro de Ciências Agrárias
Com cópia para Sr^a Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG)

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 6.001 - CEP 86051-990 - Internet <http://www.uel.br>
Hospital Universitário/Centro de Ciências da Saúde: Av. Robert Koch, 60 - Vila Operária - Fone (043) 381-2000 PABX - Fax 337-4041 e 337-7495 - Caixa Postal 791 - CEP 86038-440
LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

ANEXO A

Normas para publicação da Revisão de Literatura- Ciência Rural

1. Ciência Rural - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias que deverão ser destinados com exclusividade.

Preparação de originais

2. Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica editados em idioma Português ou Inglês, todas as linhas deverão ser numeradas e paginados no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm, com no máximo, 25 linhas em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigos científicos, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e ilustrações.** Cada figura e ilustração deverá ser enviado em arquivos separados e constituirá uma página. **Tabelas, gráficos e figuras não poderão estar com apresentação paisagem.**

3. O artigo científico deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo .doc, .pdf).

4. A revisão bibliográfica deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo .doc, .pdf).

5. A nota deverá conter os seguintes tópicos: Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** (Modelo .doc, .pdf).

6. Não serão fornecidas separatas. Os artigos estão disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista (www.scielo.br/cr).

7. Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave e resumo e demais seções quando necessários.

8. As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

9. As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

9.1. Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery.** Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros.** Manaus : INPA, 1979. 95p.

9.2. Capítulo de livro com autoria: GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

9.3. Capítulo de livro sem autoria:

COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.

TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

9.4. Artigo completo:

Sempre que possível o autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers) conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

9.6. Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo: Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

9.8. Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

9.9. Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo: Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Capturado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. Transgênicos. **Zero Hora Digital**, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Capturado em 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>.

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. 23 mar. 2000. Online. Disponível na Internet <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera

de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes: Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC

10. Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os **desenhos figuras e gráficos** (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos **300 dpi** em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

11. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

12. Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderão ser utilizados. **13.** Lista de verificação (Checklist [pdf](#) ou [doc](#))

14. A taxa de **tramitação** é de R\$ 60,00 e a de **publicação** é de R\$ 85,00 por página impressa. **A taxa de publicação somente deverá ser paga após a revisão final das provas do manuscrito pelos autores.** Professores do Centro de Ciências Rurais e os Programas de Pós-graduação do Centro têm os seus artigos previamente pagos pelo CCR, estando isentos da taxa de publicação. Trabalhos submetidos por esses autores, no entanto, devem pagar a taxa de tramitação. No caso de impressão colorida, todos os trabalhos publicados deverão pagar um adicional de R\$ 480,00 por página colorida impressa, independentemente do número de figuras na respectiva página.

Os **pagamentos** poderão ser efetuados por:

a) Transferência/depósito no Banco do Brasil, Agência 1484-2, Conta Corrente 250945-8 em nome da FATEC (CNPJ: 89.252.431/0001-59) - Projeto 96945. **A submissão do artigo obrigatoriamente deve estar acompanhada da taxa de tramitação**, podendo ser enviada via fax (55 3220 8695/3220 8698) ou ainda enviado por email (cienciarural@mail.ufsm.br) para que se possa fazer a verificação e prosseguir com a tramitação do artigo (Em ambos os casos o nome e endereço completo são obrigatórios para a emissão da fatura).

b) Solicitação de fatura (.doc ou .pdf). Nessa modalidade o formulário disponível deverá ser encaminhado devidamente preenchido via e-mail ou fax (55 3220 8695/3220 8698) para que possamos encaminhar a solitação a Fundação que administra os nossos recursos e esta encaminhará a fatura ao endereço especificado no formulário.

c) O pagamento da taxa de tramitação também pode ser feito por meio online através de **cartão de crédito (VISA)** através deste [link](#)

15. Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

16. Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

17. Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.

ANEXO B

Normas para publicação do Artigo 1- Ciência e Agrotecnologia

Escopo e política

A publicação de artigos dependerá da observância das Normas Editoriais, dos pareceres do Corpo Editorial e da Comissão ad hoc. Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial, e tanto os autores quanto os membros do Corpo Editorial e/ou Comissão ad hoc não obtêm informações identificadoras entre si.

Forma e preparação de manuscritos

1. Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
2. A Revista "Ciência e Agrotecnologia", editada bimestralmente pela Editora da Universidade Federal de Lavras (Editora UFLA), publica artigos científicos nas áreas de "Ciências Agrárias, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Economia e Administração do Agronegócio, Engenharia Rural, Medicina Veterinária e Zootecnia", elaborados por membros da comunidade científica nacional e internacional. É condição fundamental que os artigos submetidos à apreciação da "Revista Ciência e Agrotecnologia" não tenham sido e nem serão publicados simultaneamente em outro lugar. Com a aceitação do artigo para publicação, os editores adquirem amplos e exclusivos direitos sobre o artigo para todas as línguas e países. A publicação de artigos dependerá da observância das Normas Editoriais, dos pareceres do Corpo Editorial e da Comissão *ad hoc*. Todos os pareceres têm caráter sigiloso e imparcial e, tanto os autores, quanto os membros do Corpo Editorial e/ou Comissão *ad hoc* não obtêm informações identificadoras entre si.
3. **Custo para publicação:** O custo da publicação é de R\$30,00 (trinta reais) por página editorada (página impressa no formato final) até seis páginas e R\$60,00 (sessenta reais) por página adicional. No encaminhamento inicial, efetuar o pagamento de R\$80,00 (oitenta reais), **não reembolsável**, valor esse a ser descontado no custo final do artigo editorado (formato final). Por ocasião da submissão, deverá ser encaminhado o comprovante de depósito ou transferência bancária a favor de FUNDECC/Editora, Banco do Brasil, agência 0364-6, conta corrente 58.382-0. **O comprovante de depósito ou transferência bancária deve ser anexado no campo "Transferência de Documentos Suplementares"**.
4. Os artigos submetidos para publicação deverão ser encaminhados via **eletrônica** (www.editora.ufla.br), editados em **língua inglesa** e usar somente nomenclaturas oficiais e abreviaturas consagradas. O trabalho deverá ser digitado no processador de texto Microsoft Word for Windows (versão 98, 2000, 2003 ou XP), tamanho A4 (21cm x 29,7cm), espaço duplo entre linhas, fonte: Times New Roman, tamanho: 12, observada uma margem de 2,5 cm para o lado esquerdo e de 2,5 cm para o direito, 2,5 cm para margem superior e inferior, 2,5 cm para o cabeçalho e 2,5 cm para o rodapé. Cada trabalho deverá ter no **máximo 16 páginas** e junto do mesmo deverá ser encaminhado ofício dirigido ao Diretor da Editora UFLA, solicitando a publicação do artigo. Esse ofício deverá ser assinado por todos os autores, constar nome dos autores sem abreviação, a titulação e o endereço profissional completo (rua, nº, bairro, caixa postal, cep, cidade, estado) telefone e e-mail de todos; **ao submeter o artigo, o ofício deverá ser anexado no campo "Transferência de Documentos Suplementares"**. Qualquer inclusão, exclusão ou alteração na ordem dos autores deverá ser notificada mediante ofício assinado por todos os autores (inclusive do autor excluído).
5. O **artigo científico** deverá conter os seguintes tópicos:
 - a) **TÍTULO** (em letras maiúsculas) em **inglês e português**, escrito de maneira clara, concisa e completa, sem abreviaturas e palavras supérfluas. Recomenda-se começar pelo termo que represente o aspecto mais importante do trabalho, com os demais termos em ordem decrescente de importância;
 - b) **NOME(S) DO(S) AUTOR(ES)** listados no lado direito, um debaixo do outro, **sendo o máximo de 6** (seis);
 - c) **ABSTRACT** não deve ultrapassar **250** (duzentos e cinquenta) palavras e estar em um único parágrafo. **Deve conter pelo menos, breve introdução, objetivo e resultados**
 - d) **INDEX TERMS** contendo entre 3 (três) e 5 (cinco) palavras-chave em inglês que identifiquem o conteúdo do artigo, diferentes daquelas constantes no título e separadas por vírgula;

- e) **RESUMO** (tradução para o português do abstract);
 f) **TERMOS PARA INDEXAÇÃO** (tradução para o português do index terms);
 g) **INTRODUCTION** (incluindo a revisão de literatura e objetivo); h) **MATERIAL AND METHODS**;
 i) **RESULTS AND DISCUSSION** (podendo conter tabelas e figuras);
 j) **CONCLUSION**;
 k) **ACKNOWLEDGEMENTS** (opcional);
 l) **REFERENCES** (sem citações de teses e dissertações).

6. **RODAPÉ:** Deve constar formação, titulação, instituição de vínculo empregatício, contendo endereço comercial completo (rua, número, bairro, Cx. P., CEP, cidade, estado) e e-mail do autor correspondente. Os demais autores devem informar a formação, titulação e instituição de vínculo empregatício.

7. **AGRADECIMENTOS (acknowledgements):** ao fim do texto e, antes das Referências Bibliográficas, poderão vir os agradecimentos a pessoas ou instituições. O estilo, também aqui, deve ser sóbrio e claro, indicando as razões pelas quais se fazem os agradecimentos.

8. **TABELAS E QUADROS:** deverão ser feitos no Word e inseridos após citação dos mesmos dentro do próprio texto, salvo em doc.

9. **CASO O ARTIGO CONTENHA FOTOGRAFIAS, GRÁFICOS, FIGURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS, ESSAS DEVERÃO OBEDECER ÀS SEGUINTE NORMAS:**

9.1 Fotografias podem ser **coloridas ou em preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto, após a citação das mesmas, **salvas em extensão "TIFF" ou "JPEG" com resolução de 300 dpi**. Na versão impressa da revista, as fotografias sairão em **preto e branco**.

9.2 Figuras podem ser **coloridas ou em preto e branco**, nítidas e com contraste, inseridas no texto, após a citação das mesmas, **salvas em extensão "TIFF" ou "JPEG" com resolução de 300 dpi**. As figuras deverão ser elaboradas com letra **Times New Roman, tamanho 10, sem negrito; sem caixa de textos e agrupadas**. Na versão impressa da revista, as figuras sairão em **preto e branco**.

9.3 Gráficos deverão ser inseridos no texto após a citação dos mesmos. Esses deverão ser elaborados preferencialmente em Excel, com letra Times New Roman, tamanho 10, **sem negrito, salvos em extensão XLS e transformados em TIFF ou JPG**, com resolução de 300 dpi.

9.4 Símbolos e Fórmulas Químicas deverão ser feitas em processador que possibilite a formatação para o programa **Page Maker** (ex: MathType, Equation), sem perda de suas formas originais.

10. **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:** a partir do Volume 18, Número 1 de 1994, a normalização das referências bibliográficas é baseada na NBR6023/2002 da ABNT.

A exatidão das referências constantes da listagem e a correta citação no texto são de responsabilidade do(s) autor(es) do artigo.

Orientações gerais:

- Devem-se apresentar todos os autores do documento científico (fonte);
- O nome do periódico deve ser descrito por extenso, não deve ser abreviado;
- Em todas as referências deve-se apresentar o local de publicação (cidade), a ser descrito no lugar adequado para cada tipo de documento; -As referências devem ser ordenadas alfabeticamente e "alinhadas à margem esquerda", conforme NBR6023/2002 (ABNT, 2002, p.3).
- Deve-se deixar espaçamento simples nas entrelinhas e duplo entre as referências.

EXEMPLIFICAÇÃO (TIPOS MAIS COMUNS):

ARTIGO DE PERIÓDICO: DINIZ, E.R.; SANTOS, R.H.S.; URQUIAGA, S.S.; PETERNELLI, L.A.; BARRELLA, T.P.; FREITAS, G.B. de. Crescimento e produção de brócolis em sistema orgânico em função de doses de composto. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.5, p.1428-1434, set./out. 2008.

LIVRO:

- a) Livro no todo: FERREIRA, D.F. **Estatística multivariada**. Lavras: UFLA, 2008. 672p.
 b) Parte de livro com autoria específica: BERGEN, W.G.; MERKEL, R.A. Protein accretion. In: PEARSON, A.M.; DUTSON, T.R. **Growth regulation in farm animals: advances in meat research**. London: Elsevier Science, 1991. v.7, p.169-202.
 c) Parte de livro sem autoria específica: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido muscular. In: _____. **Histologia básica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524p.

DISSERTAÇÃO E TESE: Não utilizar citações de dissertações e teses.

TRABALHOS DE CONGRESSO E OUTROS EVENTOS: Não utilizar citações de trabalhos de congressos e outros eventos.

DOCUMENTOS ELETRÔNICOS:

As obras consultadas *online* são referenciadas conforme normas específicas para cada tipo de documento, **acrescidas de informações sobre o endereço eletrônico apresentado entre braquetes (< >), precedido da expressão "Disponível em:" e da data de acesso ao documento, precedida da expressão "Acesso em:"**. Nota: "Não se recomenda referenciar material eletrônico de curta duração nas redes" (ABNT, NBR6023/2000, p. 4). Segundo padrões internacionais, a divisão de endereço eletrônico, no fim da linha, deve ocorrer sempre após barra (/).

a) Livro no todo TAKAHASHI, T. (Coord.). **Tecnologia em foco**. Brasília, DF: Socinfo/MCT, 2000. Disponível em: <<http://www.socinfo.org.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

b) Parte de livro TAKAHASHI, T. Mercado, trabalho e oportunidades. In: _____. **Sociedade da informação no Brasil**: livro verde. Brasília, DF: Socinfo/MCT, 2000. cap.2. Disponível em: <<http://www.socinfo.gov.br>>. Acesso em: 22 ago. 2000.

c) Artigo de periódico (acesso online): JASPER, S.P.; BIAGGIONI, M.A.M.; RIBEIRO, J.P. Avaliação do desempenho de um sistema de secagem projetado para os pequenos produtores rurais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.4, p.1055-1061, jul./ago. 2008. Disponível em: <[http://www.editora.ufla.br/revista/32_4/\(04\)%20Artigo%204193.pdf](http://www.editora.ufla.br/revista/32_4/(04)%20Artigo%204193.pdf)>. Acesso em: 25 nov. 2008.

CITAÇÃO: PELO SISTEMA ALFABÉTICO (AUTOR-DATA) (baseado na ABNT, NBR10520/2002):

Dois autores - Silva & Leão (2008) ou (Silva & Leão, 2008). Três ou mais autores - Ribeiro et al. (2008) ou (Ribeiro et al., 2008). Obs.: Quando forem citados dois autores de uma mesma obra deve-se separá-los pelo sinal & (comercial). Se houver mais de uma citação no mesmo texto, deve-se apresentar os autores em ordem cronológica crescente, por exemplo: Souza (2004), Pereira (2006), Araújo (2007) e Nunes Júnior (2008); ou: (Souza, 2004; Pereira, 2006; Araújo, 2007; Nunes Júnior, 2008).

11. Processo para publicação de artigos: O artigo submetido para publicação, será encaminhado ao Conselho Editorial, para que seja inicialmente avaliado quanto à relevância comparativa a outros manuscritos da área de conhecimento submetidos para publicação. Apresentando relevância comparativa, o artigo é avaliado por consultores 'ad hoc' para emitirem seus pareceres. Aprovado por consultores e, caso necessário, o artigo é enviado ao autor correspondente para correções e/ou sugestões. Caso as correções não sejam retornadas à revista no prazo solicitado, a tramitação do artigo será automaticamente cancelada. O não atendimento as solicitações dos consultores sem justificativas também leva ao cancelamento automático do artigo. Após a aprovação das correções, o artigo é revisto quanto a Nomenclatura Científica, Inglês, Referências Bibliográficas e Português, sendo então encaminhado para editoração e publicação.

ANEXO C

Normas para publicação do Artigo 2- Toxicology

Article

structure

Manuscripts should be typewritten double spaced.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential

title

page

information

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

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional and should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

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

Keywords

Immediately after the abstract, provide 3 to maximum 6 keywords that include the full chemical name(s). Use British spelling and avoid general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

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

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

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

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

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

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray

scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

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

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. Two authors: both authors' names and the year of publication;

3. Three or more authors: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:
Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:
Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>.

Supplementary

data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.