



**UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA**

ALEXANDRE AUGUSTO SASAKI

**EFEITO DA FUMONISINA NA RESPOSTA IMUNE CELULAR
E HUMORAL NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Londrina
2007

ALEXANDRE AUGUSTO SASAKI

**EFEITO DA FUMONISINA NA RESPOSTA IMUNE CELULAR
E HUMORAL NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2007

ALEXANDRE AUGUSTO SASAKI

**EFEITO DA FUMONISINA NA RESPOSTA IMUNE CELULAR
E HUMORAL NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 08 de fevereiro de 2007.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia I do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina sob orientação da Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano e contou com o apoio da Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação Araucária, CNPq, FINEP e PROPPG/UEL.

DEDICATÓRIA

À minha família e minha namorada, Érica Akemi Kavati.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, por tudo que me ensinou como pesquisador e ser humano. Seu exemplo de profissionalismo, dedicação ficarão para sempre marcados em minha vida.

Aos professores Elisa Yoko Hirooka, Elisabete Yurie Sataque Ono, Phileno Pinge-Filho – UEL-PR, por toda a ajuda e orientação na realização deste trabalho.

Aos coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental Maria Angélica Ehara Watanabe e Mario Augusto Ono.

A todos os professores e alunos do mestrado, pela realização de um trabalho muito especial.

A Mari Sumigawa Kaminami e Nilson de Jesus Carlos, por terem sido também meus professores, companheiros de trabalho e amigos.

Agradeço aos companheiros e amigos de laboratório Juliana Gerez Rubira, Andréa Longoni Fredrich Isaacsson, Fernanda Akemi Nakanishi, Solange de Paula Ramos, Audrey de Souza Marques, Berenice Tomoko Tatibana, Nádia Hizuru Kamiji, Kátia Key Oshiro, Rosália Hernandez Fernandes Vivian, Thiago Yuiti Castillo Massuda, Luciene Aire Nagashima, Paula Cesar Leonello, Thiago Cezar Fujita, Welder Franzini Amaral Callera, Carlos Eduardo Alves de Sousa e Newton Hashimoto. Saibam que a ajuda e dedicação de vocês foram peças fundamentais na elaboração deste trabalho.

Aos companheiros de mestrado, Paulo Roberto Ceridório Corrêa, Alexandre Yukio Saito, por todo o apoio e amizade.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos Luciana Pereira Bernd, Luciana Hayashi, Simone Fujii, Aniê Ieda Francabandiera e Joice Sifuentes dos Santos.

Aos amigos do Programa de Mestrado em Biotecnologia Elaine Cunha Moreno e Alexandre Tadachi Morey.

Aos funcionários do Departamento de Ciências Patológicas do Centro de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina: Ana Maria Rodrigues, Pedro Sebastião Raimundo Dionizio Filho, Jesus Antônio Vargas.

Aos funcionários do Laboratório de Pós-graduação do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina: Lúcia, Jair, Marcelo e Maria Emília Favaro.

SASAKI, Alexandre Augusto. **Efeito da Fumonisina na Resposta Imune Celular e Humoral na Paracoccidiodomicose Experimental em Camundongos.** 2007. 47f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

RESUMO

O presente trabalho investigou o efeito de fumonisina (FB) parcialmente purificada de *Fusarium verticillioides* 103F, um fungo contaminante de milho e outros cereais, no curso da paracoccidiodomicose (PCM), a micose sistêmica mais importante da América Latina, sendo o Brasil um centro endêmico. Devido à cronicidade e à prevalência da doença, existe a possibilidade de ocorrer a infecção pelo fungo *Paracoccidiodoides brasiliensis* (Pb), agente etiológico da PCM e contaminação concomitante por fumonisina ingerida, especialmente na região endêmica de PCM. Tendo como objetivo avaliar o efeito da FB na resposta imune humoral e celular em PCM experimental, camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos de 6 animais ("PBS", "PBS+FB", "Pb" e "Pb+FB"). Dois grupos de animais (Pb e Pb+FB) foram inoculados (i.v.) com 1×10^5 leveduras (Pb18) e como controle com PBS estéril (PBS e PBS+FB). Após 28 dias, os grupos PBS+FB e Pb+FB foram inoculados (s.c) com FB parcialmente purificada e os grupos PBS e Pb com PBS estéril. Após 7 dias foram coletadas as amostras de sangue para análise de resposta imune humoral e de antigenemia. O baço foi removido para avaliação da resposta imune celular. A avaliação da resposta imune humoral foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA), sendo utilizado ELISA indireto com preparado antígeno livre de célula (CFA) de Pb18 e ELISA captura utilizando anticorpos policlonais e monoclonais específicos para gp43 para análise de antigenemia. A avaliação da resposta imune celular foi realizada por teste de hipersensibilidade tardia (DTH) e por meio de cultura de linfócitos estimulados com antígenos de Pb para avaliação da resposta específica e com mitógeno concanavalina A (ConA). Adicionalmente, foi avaliada a produção "in vitro" de óxido nítrico (NO) por células esplênicas estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS). A avaliação da resposta imune humoral aos antígenos de Pb não demonstraram diferença significativa em relação ao grupo infectado e tratado com a FB, bem como os resultados de análise de antigenemia. O teste de DTH e resposta linfoproliferativa aos antígenos específicos também não demonstraram diferença significativa nos grupos tratados com FB. No entanto foi observada inibição significativa ($p < 0,001$) na resposta linfoproliferativa a ConA no grupo tratado com a FB em relação ao grupo controle. Os resultados de dosagem de NO também demonstraram nível inferior nos camundongos tratados com FB ou infectado com Pb. Concluímos pelos resultados de avaliação de resposta imune que a FB inoculada em um único dia não afeta a resposta imune celular ou humoral específica ao fungo Pb, todavia pode suprimir a resposta linfoproliferativa a mitógeno ConA e produção de NO pelos esplenócitos.

Palavras-chave: *Paracoccidiodoides brasiliensis*. Paracoccidiodomicose. *Fusarium verticillioides*. Fumonisina. Micotoxina.

SASAKI, Alexandre Augusto. **Effect of Fumonisin on Cellular and Humoral Immune Response in Experimental Paracoccidioidomycosis in Mice.** 2007.

47f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

ABSTRACT

The present work investigated the effect of partially purified fumonisin (FB) from *Fusarium verticillioides* 103F, a contaminant fungi of maize and other cereals, in course of paracoccidioidomycosis (PCM), the most important systemic mycosis of Latin America, being Brazil a endemic region. Due to cronicity and prevalence of disease there is the possibility of infection with *Paracoccidioides brasiliensis*, the etiological agent of PCM, and concomitant contamination by ingested fumonisin, especially in a endemic region of PCM. The objective of this work was to evaluate the effect of FB on humoral and cellular immune response in experimental PCM. Male BALB/c mice divided into 4 groups of 6 animals (PBS, PBS+FB, Pb and Pb+FB). Two groups (Pb and Pb+FB) were inoculated i.v. with 1×10^5 yeast cells (Pb18, PBS and PBS+FB with sterile PBS as control. After 28 days PBS+FB and Pb+FB groups were inoculated s.c. with the partially purified FB and PBS and Pb groups with sterile PBS. After 7 days blood samples were collected to analyze humoral immune response and antigenemia. Spleen was removed to analyze cellular immune response. Evaluation of humoral immune response was performed by immunoenzimatic assay (ELISA), using indirect ELISA with cell-free antigen (CFA) from Pb18 and capture ELISA, using specific polyclonal and monoclonal antibodies to gp43, to evaluate antigenemia. Evaluation of cellular immune response were performed by delayed type hipersensibility test (DTH) and by lymphocyte culture stimulated with Pb antigens, for specific immune response, and with concanavalin A (ConA). In addition, in vitro oxide nitric (NO) production from spleen cells stimulated with lipopolysaccharide were analyzed. Evaluation of humoral immune response to Pb antigens did not show significant difference between infected and infected and treated with FB group, as well as results for antigenemia analyses. DTH test and lymphoproliferative response to specific antigens also did not show significative results between FB treated groups. However, significative inhibition ($p < 0,001$) was observed in lymphoproliferative response to ConA in Fb treated group in relation with control group. Results from NO determination also demonstrated lower levels in FB treated and/or infected mice. We concluded that FB inoculated in a single day did not affect the cellular or humoral specific response to Pb, but it can suppress the lymphoproliferative response to ConA and NO production by splenocytes.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomycosis. *Fusarium verticillioides*. Fumonisin. Mycotoxin.

LISTA DE FIGURAS GERAL

Figura 1 – Estrutura química da Fumonisina B ₁	15
Figura 2 – A) Estrutura química da esfingosina; B) Estrutura química da ceramida; C) Estrutura química da esfingomielina	16

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1 – A) Perfil cromatográfico de padrão de FB; B) Perfil cromatográfico da FB ₁ parcialmente purificada de extrato de <i>F. verticillioides</i>	36
Figura 2 – ELISA de detecção de anticorpos anti-CFA	37
Figura 3 – Teste de DTH	38
Figura 4 – Estimulação da proliferação celular com exoantígeno	39
Figura 5 – Estimulação da proliferação celular com ConA	40
Figura 6 – Quantificação da liberação de NO	41
Figura 7 – ELISA de detecção de gp43	42

LISTA DE SIGLAS

- CFA** – antígeno livre de célula
- ConA** – concanavalina A
- DTH** – hipersensibilidade tardia
- ELISA** – reação imunoenzimática
- Esf_g** – esfingolipídeos
- ExoAg** – exoantígeno
- FB₁** – fumonisin B₁
- G** – grama
- G** – força centrífuga relativa
- gp43** – glicoproteína de 43 kDa
- HPLC** – cromatografia líquida de alta eficiência
- IgG** – Imunoglobulina G
- INF- γ** – interferon- γ
- INOS** – óxido nítrico sintase
- i.v.** – intravenosa
- kDa** – kilo Dalton
- LPS** – lipopolissacarídeo
- μ g** – micrograma
- μ L** – microlitro
- mg** – miligrama
- mL** – mililitro
- mM** – milimolar
- mV** – milivolts
- nm** – nanometro
- NO** – óxido nítrico
- OPD** – ortho-phenylenediamine
- Pb** – *Paracoccidioides brasiliensis*
- PBS** – tampão fosfato salina
- PCM** – Paracoccidioidomicose
- PMSF** – Phenylmethylsulfonyl Fluoride
- RNI** – intermediários reativos de nitrogênio

s.c. – subcutâneo

TNF- α – fator de necrose tumoral- α

TCA – ácido tricarbóxico

Th1 – T auxiliar 1 (T helper 1)

Th2 – T auxiliar 2 (T helper 2)

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 FUMONISINAS	14
1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE	17
2 OBJETIVOS	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3 ARTIGO: EFEITO DA FUMONISINA NA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM CAMUNDONGOS	20
3.1 RESUMO	20
3.2 ABSTRACT	21
3.3 INTRODUÇÃO	22
3.4 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.4.1 Preparo do Extrato de Fumonisinas	23
3.4.2 Animais.....	23
3.4.3 Cultivo de Paracoccidiodes brasiliensis.....	23
3.4.4 Produção de Antígeno Livre de Célula (CFA)	24
3.4.5 Inoculação de Pb.....	24
3.4.6 Delineamento Experimental	24
3.4.7 Reação Imunoenzimática (ELISA) para Detecção de Anticorpos Anti-CFA.....	25
3.4.8 Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH)	25
3.4.9 Ensaio de Linfoproliferação	26
3.4.10 Quantificação de NO	26
3.4.11 Reação de ELISA para Detecção de Gp43	26
3.4.12 Análise estatística	27
3.5 RESULTADOS.....	27
3.5.1 Preparo do Extrato de Fumonisina.....	27
3.5.2 ELISA para Detecção de IgG Anti-CFA.....	27
3.5.3 Teste de DTH.....	28
3.5.4 Estimulação da Proliferação Celular com Exoantígeno.....	28
3.5.5 Estimulação de Proliferação Celular com Mitógeno ConA	28

3.5.6	Quantificação de Óxido Nítrico (NO)	28
3.5.7	ELISA de Detecção de Gp43	29
3.6	DISCUSSÃO	29
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
	REFERÊNCIAS	43

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 FUMONISINAS

Fusarium verticillioides (sinônimo: *F. moniliforme*; teleomorfo: *Gibberella moniliformis*) é o fungo prevalente associado em milho (JURGENSON *et al.*, 2002). Esta matéria-prima é utilizada para consumo humano e animal no mundo (JACKSON *et al.*, 1996), portanto exposto à fumonisina B₁ (FB₁) a principal micotoxina relacionada à espécie.

Ono *et al.* (2000, 2001) analisaram 150 amostras de milho recém-colhido (safras 1995 e 1996), de três regiões do estado do Paraná, por ensaio imunoenzimático (ELISA) competitivo indireto e detectou a presença fumonisinas em 98% das amostras em concentrações de 0,096 a 22,6 µg/g.

Embora não existam limites máximos estabelecidos para fumonisinas, o “Mycotoxin Committee of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians” recomenda o máximo de 5, 10, 50 e 50 µg/g para ração de eqüinos, suínos, bovinos e aves, respectivamente (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Na Suíça é recomendado o limite máximo de 1µg/g para derivados de milho destinado ao consumo humano (VISCONTI; BOENKE, 1995).

As fumonisinas são micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* (TARANU *et al.*, 2005), contaminantes de milho e outros cereais (GELDERBLUM *et al.*, 1988). Dentre mais de 28 análogos de fumonisinas isoladas e caracterizadas, a FB₁ é a mais comum no milho (RHEEDER *et al.*, 2002).

A FB₁ é composta por um diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbóxico (TCA) e 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroieicosano, onde os grupos C₁₄ e C₁₅ se apresentam esterificados com o grupo carboxil terminal do ácido tricarbóxico (Figura 1) (SYDENHAM *et al.*, 1996).

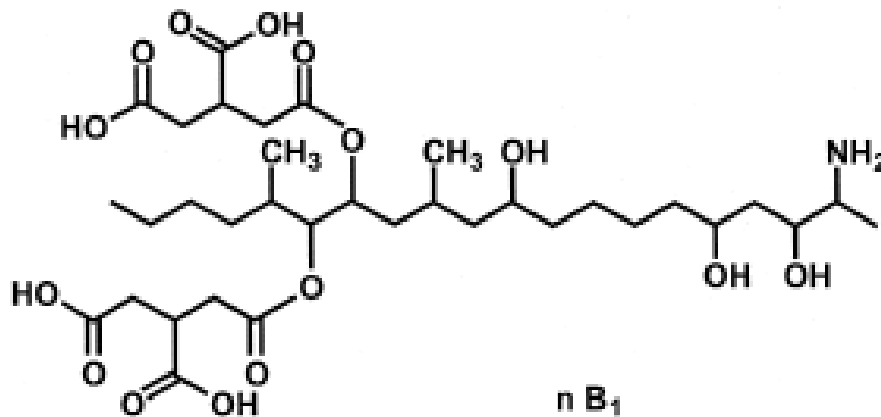


Figura 1 – Estrutura química da Fumonisina B₁.

A FB₁ é um composto altamente polar, solúvel em água e insolúvel em solventes apolares (SCOTT, 1993). Os grupamentos TCA e amina conferem toxicidade à FB₁ e a sua remoção pode reduzir a toxicidade num fator de 10 e 50 vezes, respectivamente (MERRIL *et al.*, 1993).

Estudos epidemiológicos sugerem a relação entre a ingestão da micotoxina e o câncer esofágico e hepático em humano (SYDENHAM *et al.*, 1990; UENO *et al.*, 1997). A associação entre a FB₁ e patologias como leucoencefalomalácia em eqüinos (MARASAS *et al.*, 1988), edema pulmonar em suínos (COLVIN; HARRISON, 1992) bem como efeito carcinogênico em ratos e camundongos (GELDERBLOM *et al.*, 1991; HOWARD *et al.*, 2001) tem sido relatados.

Embora o mecanismo de ação da FB₁ não seja completamente elucidado, sabe-se que a FB₁ tem a capacidade de afetar o metabolismo de esfingolipídeos (Esfg).

Em 1884, Johann Ludwig Wilhelm Thudichum nomeou os Esfg em referência à sua natureza enigmática e à esfinge, figura da mitologia grega. A característica estrutural de Esfg consiste de uma longa cadeia constituída de 18 a 20 átomos de carbono (esfingóide) e alguns grupos hidroxil (*e.g.* esfingosina) (Figura 2A). Entretanto, a acilação da amina com ácidos graxos resulta em compostos mais complexos (*e.g.* ceramida) (Figura 2B). Se grupos polares forem adicionados à molécula a complexidade aumenta (*e.g.* esfingomiéline) (Figura 2C) (HANNUM; BELL, 1989; PRIESCHL; BAUMRUKER, 2000; SAKAI; KOEZUKA, 1998).

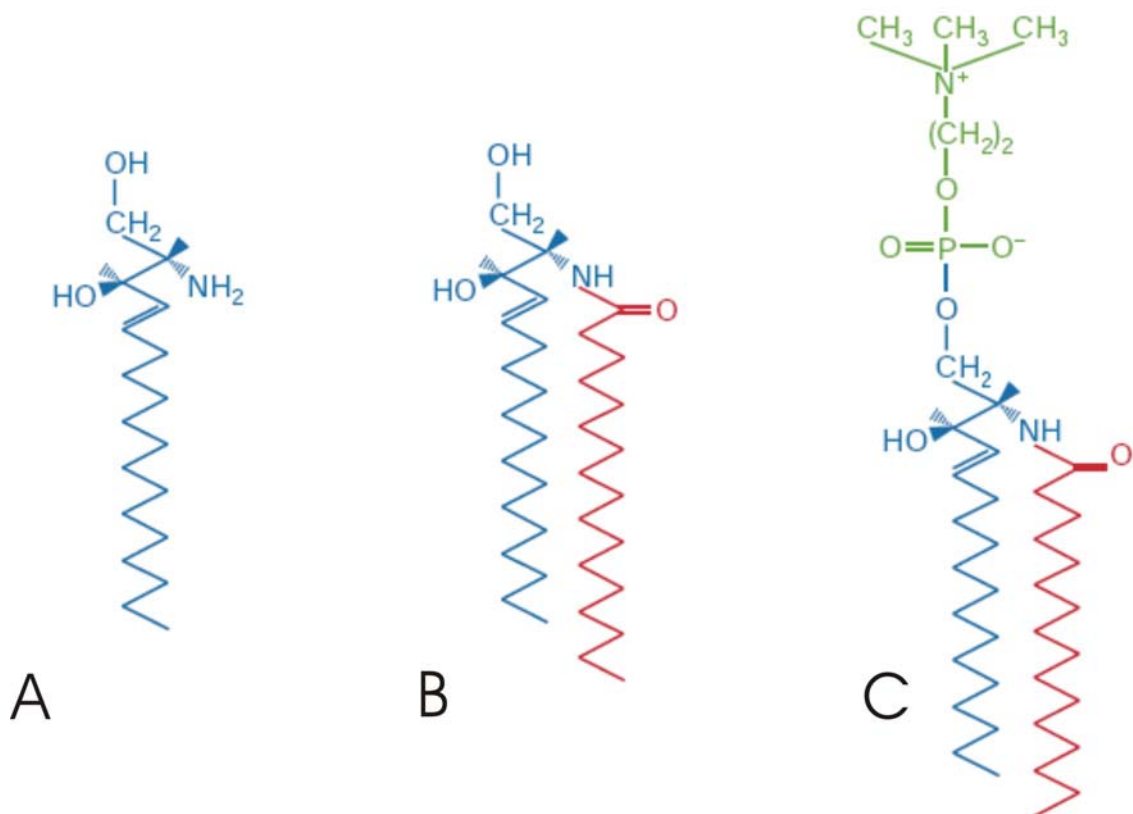


Figura 2 – A) Estrutura química da esfingosina; B) Estrutura química da ceramida; C) Estrutura química da esfingomielina.

Esfingolípídeos são componentes essenciais da membrana celular de eucariotos. Em mamíferos a ceramida, esfingosina, esfingosina-1-fosfato e glicosilceramida são os esfingolípídeos mais estudados (HEUNG, *et al.*, 2006) e exercem importantes funções como a regulação de apoptose de células T (ceramida e esfingosina-1-fosfato) (CUVILLIER *et al.*, 1996). Além disso, a esfingomielina, ceramida, esfingosina e esfingosina-1-fosfato (via da esfingomielina) estão envolvidas na resposta celular a vários estímulos, como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (XIA, *et al.*, 1999).

A FB₁ apresenta estrutura semelhante às bases esfingolípídeas que estão presentes nos esfingolípídeos, e atua como inibidor competitivo da enzima ceramida sintase (esfingonina ou esfingosina N-aciltransferase), em consequência do bloqueio da enzima ocorre redução da síntese de esfingolípídeos complexos e acúmulo de esfingonina (SORIANO *et al.*, 2005).

Poucos trabalhos têm analisado a influência da FB₁ no sistema imunológico. Em galinhas, tem sido descrito que o consumo de FB₁ diminui a produção de anticorpos, a proliferação de linfócitos e a função de macrófagos (MARIJANOVIC *et al.*, 1991; LI *et al.*, 1999; QURESHI *et al.*, 1995) e em roedores a FB₁ diminui a resposta contra eritrócitos de carneiro (MARTINOVA; MERRILL, 1995) com aumento da secreção de TNF- α por macrófagos peritoneais (DUGYALA *et al.*, 1998), aumentou do nível de Imunoglobulina G (IgG) sérica e diminuição do “clearance” esplênico de *Listeria monocytogenes* (TRYPHONAS *et al.*, 1997).

Ensaio celulares mostraram que macrófagos peritoneais de camundongos alimentados com FB₁ produzem maior quantidade de TNF- α em resposta ao lipopolissacarídeo (LPS) do que os controles (QUANREN *et al.*, 2001). Outro estudo envolvendo a incubação de células J774A.1 com FB₁ mostrou que ela é capaz de afetar a estrutura e a função da membrana contribuindo assim para a patogênia da micotoxicose (FERRANTE *et al.*, 2002).

Apesar do potencial tóxico e carcinogênico da FB₁ muitos países ainda não estabeleceram níveis máximos tolerados de micotoxinas em alimentos e ração (WU, 2006), assim a contaminação por esta toxina em indivíduos ou animais imunossuprimidos, poderia agravar uma doença já estabelecida.

1.2 PARACOCCIDIOIDOMICOSE

Dentre as doenças infecciosas associadas à imunodepressão, a paracoccidioidomicose (PCM) destaca-se como micose sistêmica mais importante da América Latina, sendo o Brasil um centro endêmico (BLOTTA; CAMARGO, 1993). O agente etiológico, *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), um fungo termodimórfico (FRANCO *et al.*, 2000). O fungo possivelmente penetra no organismo através das vias aéreas superiores sendo desenvolvido o foco primário no pulmão podendo a seguir disseminar-se pelas vias linfáticas e hematogênicas (MCEWEN *et al.*, 1987).

Duas principais formas clínicas se manifestam na PCM a aguda ou sub-aguda (forma juvenil) e crônica (forma adulta). A primeira se caracteriza por se desenvolver em semanas ou meses, cuja severidade conduz a altas taxas de mortalidade e envolve o sistema retículoendotelial. Nesses pacientes a imunidade celular está severamente deprimida e envolve crianças e adultos jovens. A segunda,

cerca de 90% dos casos, afeta principalmente homens adultos e progride lentamente, pode levar meses ou anos para se desenvolver completamente e pode ser unifocal envolvendo apenas um órgão ou multifocal (BRUMMER *et al.*, 1993).

Diferenças no padrão de resposta imune entre os indivíduos contra o Pb são importantes para a determinação da progressão e efeitos da doença (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Estudos experimentais mostraram que a resistência contra o Pb está associada ao padrão Th1 da resposta imune (CALICH; KASHINO, 1998). Por outro lado, a susceptibilidade está ligada ao padrão de resposta Th2 (CANO *et al.*, 1998).

Baida *et al.* (1999), demonstraram que pacientes com a forma aguda da doença tem maior nível de IgG total que pacientes com a forma crônica associando assim a alta carga fúngica em pacientes com a forma aguda.

Macrófagos desempenham papel fundamental na resistência contra o Pb, quando ativados pelo IFN- γ , TNF- α ou por LPS produzem duas classes de reativos com atividade citotóxica, os intermediários reativos de oxigênio e intermediários reativos de nitrogênio (RNI). Um dos mais importantes RNI, o óxido nítrico (NO) é gerado pela oxidação do aminoácido L-arginina e a enzima óxido nítrico sintase (iNOS), responsável pela produção de NO e a sua ativação envolve a inflamação e a infecção. González *et al.* (2000) demonstraram correlação da inibição da transformação micelial para levedura de Pb em macrófagos peritoneais ativados com IFN- γ recombinante e a produção de NO.

O fungo apresenta uma complexa estrutura de proteínas e glicoproteínas com massas moleculares de 13 à 148 kDa. O antígeno imunodominante durante a infecção por Pb é a gp43 (SANDOVAL *et al.*, 1996), pois é reconhecida por 100% dos soros de pacientes (TRAVASSOS *et al.*, 1995) e a sua dosagem é utilizada tanto como meio de diagnóstico (MENDES-GIANNINI *et al.*, 1989) bem como para avaliar a severidade da doença (DA SILVA *et al.*, 2004).

Os preparados antigênicos de Pb mais estudados para a avaliação da resposta imunológica são preparados de antígeno livre de célula (CFA), sobrenadante de cultivo de Pb, denominado de exoantígeno (ExoAg), bem como o principal antígeno de Pb, a glicoproteína de 43 kDa (gp43). Utilizando estes antígenos, no presente trabalho avaliou-se o efeito de FB₁ parcialmente purificada na resposta imunológica na PCM experimental, um modelo de doença bem estabelecido e com relação muito próxima com a patologia em humanos.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho analisou o efeito da FB₁ de *Fusarium verticillioides* 103F sobre a resposta imunológica de camundongos infectados com Pb.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Determinar o nível de anticorpos anti-CFA no soro de camundongos;
- II. Analisar a resposta imune celular por teste de hipersensibilidade tardia;
- III. Analisar a resposta proliferativa de linfócitos do baço estimulados com antígeno fúngico e concanavalina A;
- IV. Avaliar o nível de NO produzido por macrófagos esplênicos estimulados com LPS;
- V. Determinar o nível de gp43 solúvel no soro de camundongos.

3 ARTIGO: EFEITO DA FUMONISINA NA RESPOSTA IMUNE CELULAR E HUMORAL NA PARACOCCIDIOIDOMICOSE EM CAMUNDONGOS

RESUMO

Fumonisinias são um grupo de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides*, que podem modular a resposta imune. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da fumonisina parcialmente purificada sobre a resposta imune humoral e celular em camundongos infectados com *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM). Camundongos BALB/c machos foram divididos em 4 grupo de 6 animais (PBS, PBS+FB, Pb, Pb+FB). Os grupos Pb e Pb+FB foram inoculados i.v. com 1×10^5 leveduras de Pb18 por animal, os grupos PBS e PBS+FB com PBS estéril, como controle. Depois de 28 dias os grupos PBS+FB e Pb+FB foram inoculados s.c. com fumonisina parcialmente purificada de extrato de *F. verticillioides*, os grupos PBS e Pb receberam PBS estéril como controle. Depois de 7 dias os animais foram sacrificados e os níveis plasmáticos de IgG anti-antígeno livre de célula (CFA) e antigenemia foram analisados por ensaio imunoenzimático (ELISA). A resposta imune celular foi avaliada “in vivo” por teste de DTH e “in vitro” por ensaio de linfoproliferação utilizando células esplênicas estimuladas com antígeno de Pb e concanavalina A (ConA). Além disso, a produção de óxido nítrico (NO) por células esplênicas foi avaliada “in vitro”. A resposta imune humoral contra antígeno de Pb não mostrou diferença significativa entre os grupos Pb e Pb+FB, bem como os resultados de antigenemia. O teste de DTH e proliferação celular a antígenos específicos também não mostraram diferenças entre os grupos tratados em não tratados com a fumonisina. A proliferação celular estimulada com ConA mostrou uma inibição ($p < 0,001$) entre os grupos PBS+FB e PBS. Níveis baixos de NO foram observados nos grupos tratados com fumonisina e/ou infectados em relação ao grupo controle. Através desses resultados podemos concluir que um único dia de exposição à fumonisina não afeta a resposta imune celular específica a Pb, porém pode suprimir a resposta imune celular inespecífica e a produção de NO por esplenócitos.

Palavras chaves: *Paracoccidioides brasiliensis*. Paracoccidioidomicose. *Fusarium verticillioides*. Fumonisinias. Micotoxina.

ABSTRACT

Fumonisin are a group of mycotoxins produced mainly by *Fusarium verticillioides*, which can modulate the immune response. The aim of this study was to evaluate the effect of the partially purified fumonisins on humoral and cellular immune response in infected mice with *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), an infectious agent of paracoccidioidomycosis (PCM). Male BALB/c mice divided into 4 groups of 6 animals (PBS, PBS+FB, Pb and Pb+FB). Pb and Pb+FB were inoculated i.v. with 1×10^5 yeast cells (Pb18) per animal, PBS and PBS+FB with sterile PBS as control. After 28 days PBS+FB and Pb+FB groups were inoculated s.c. with the partially purified fumonisins from *F. verticillioides* extract, PBS and Pb groups with sterile PBS. After 7 days animals were sacrificed and the plasmatic levels of anti-cell free antigen (CFA) IgG and antigenemia were analyzed by immunoenzymatic assay (ELISA). Cellular immune response were evaluated "in vivo" using DTH assay and "in vitro" by lymphoproliferative assay using spleen cells stimulated with Pb antigens and concanavalin A (ConA). In addition, oxide nitric (NO) production from spleen cells were evaluated "in vitro". The humoral immune response against Pb antigens did not show significant difference between Pb and Pb+FB groups, as the results from antigenemia. DTH assay and proliferation response against specific antigen, also, did not show difference between treated and untreated groups with the fumonisin. Stimulated cellular proliferation with ConA shown an inhibition ($p < 0,001$) between PBS+FB and PBS groups. The lower NO levels were observed in infected and/or mycotoxin treated mice than the control group. From those results we can conclude that a single day exposure to fumonisin dose did not affect the specific immune response against Pb, but it may suppress the unspecific cellular immune response and the NO production by splenocytes.

Keywords: *Paracoccidioides brasiliensis*. paracoccidioidomycosis. *Fusarium verticillioides*. Fumonisin. Mycotoxin.

INTRODUÇÃO

Fumonisina B₁ (FB₁) e seus análogos são metabólitos secundários tóxicos produzidos, principalmente por *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum* em milho (Leslie *et al.*, 1996). A ingestão de FB₁ está relacionada com várias patologias em humanos bem como em camundongos, ratos, eqüinos, suínos (Sydenham *et al.*, 1990; Ueno *et al.*, 1997; Marasas *et al.*, 1988; Colvin e Harrison, 1992; Gelderblom *et al.*, 1991; Howard *et al.*, 2001). A FB₁ também pode modular a resposta imune, suprimindo a atividade de linfócitos T e B, a produção de anticorpos e desregulando as funções efectoras de macrófagos (Taranu *et al.*, 2006)

Apesar do potencial tóxico e carcinogênico, bem como seus efeitos depressores sobre o sistema imunológico, ainda não existe níveis máximos tolerados de fumonisinas em alimentos e ração (Wu, 2006). No Brasil, um estudo realizado por Ono *et al.* (2000, 2001) demonstrou que 98% das amostras, de milho recém-colhido, analisadas continham FB₁. Assim a contaminação por esta toxina em indivíduos ou animais imunossuprimidos, poderia agravar a doença previamente estabelecida. Dentre as doenças infecciosas associadas à imunodepressão temos a paracoccidiodomicose (PCM) a micose sistêmica mais importante da América Latina, sendo o Brasil um centro endêmico (Blotta e Camargo, 1993). O agente etiológico, *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), um fungo termodimórfico (Franco *et al.*, 2000). O fungo possivelmente penetra no organismo através das vias aéreas superiores sendo desenvolvido o foco primário no pulmão podendo a seguir disseminar-se pelas vias linfáticas e hematogênicas (McEwen *et al.*, 1987).

Diferenças no padrão de resposta imune entre os indivíduos contra o Pb são importantes para a determinação da progressão e efeitos da doença (Oliveira *et al.*, 2002). Além disso, a existência de ampla gama de manifestações clínicas da PCM pode ser devido aos fatores intrínsecos do fungo, como a sua virulência, do fator do hospedeiro bem como de outros fatores provenientes do meio externo como a micotoxina que poderia afetar a resposta imune ao fungo.

Dentre os preparados antigênicos de Pb os mais estudados para a avaliação da resposta imunológica são preparados de “antígeno livre de célula” (CFA), sobrenadante de cultivo de Pb, chamado exoantígeno (ExoAg), bem como o principal antígeno de Pb, a glicoproteína de 43 kDa (gp43).

Devido a cronicidade da doença PCM e sua prevalência no Brasil, existe a possibilidade de ocorrer a contaminação concomitante de fumonisina e de Pb, principalmente por ser o milho a base de alimentação da comunidade mais carente e a doença também afetar a população rural e humilde. Assim, no presente trabalho foi analisado efeito da micotoxina de *Fusarium verticillioides* na resposta imunológica na PCM experimental, um modelo de doença bem estabelecido e com relação muito próxima com a patologia em humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Preparo do Extrato de Fumonisinas

O extrato parcialmente purificado de fumonisinas foi obtido a partir de *F. verticillioides* cepa 103F, isolada de rações envolvidas em surto de intoxicação animal em 1991 no Estado do Paraná. A quantificação de FB₁ contida no extrato do fungo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de acordo com Shepard *et al.* (1990) modificado por Ueno *et al.* (1993). Resumidamente, o extrato de fumonisina foi diluído em acetonitrila:água (v/v) na concentração de 1:250.000 e passado para a análise em HPLC (Shimadzu), para quantificação de fumonisinas foi utilizada uma curva de calibração com padrão de fumonisinas (Acros). O extrato foi diluído em PBS estéril de modo que houvesse 11,25 mg de FB₁ por Kg de peso corpóreo em 500 µL de solução por animal.

3.4.2 Animais

24 camundongos BALB/c machos de 6 a 8 semanas foram alocados no Biotério do Laboratório de Imunologia do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram divididos em 4 grupos (6 animais cada grupo) 7 dias antes do início do experimento para o período de aclimatação. Ração e água autoclavados foram fornecidos *ad libitum*.

3.4.3 Cultivo de *Paracoccidioides brasiliensis*

Pb cepa 18, isolado de paciente, foi cultivada em ágar Saboraud Dextrose 4% (Micromed) a uma temperatura de 35°C e repicado a cada 5 dias.

3.4.4 Produção de Antígeno Livre de Célula (CFA)

O CFA foi obtido de acordo com Camargo *et al.* (1989) com algumas modificações. Amostras de *P. brasiliensis* foram coletadas em PBS estéril (pH 7,2) contendo timerosal 0,02% e inibidor de serina protease, “Phenylmethylsulfonyl Fluoride” (PMSF; Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) 2,5 mM e homogeneizadas (vortex) por 10 minutos. As amostras foram deixadas em repouso por 1 hora e 30 minutos e centrifugadas à 1956,5 g por 10 minutos à 4° C. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado à 11269,44 g por 30 minutos à 4° C. Com a coleta do sobrenadante a concentração de proteínas foi determinada por método de Lowry *et al.* (1951). As amostras foram aliqüotadas e congeladas à -20°C até o momento de uso.

3.4.5 Inoculação de Pb

A inoculação endovenosa (i.v) de Pb foi realizada com injeção de 100 µL de solução de PBS estéril contendo 1×10^5 leveduras por animal.

3.4.6 Delineamento Experimental

No primeiro dia do experimento os grupos “Pb” e “Pb+FB” foram infectados i.v. com leveduras de Pb18 (1×10^5 leveduras por animal) e os grupos “PBS” e “PBS+FB” receberam PBS estéril como controle. Após 28 dias os animais dos grupos “PBS+FB” e “Pb+FB” receberam 5 doses do extrato de fumonisinas a cada 2 horas por inoculação subcutânea num total de 11,25 mg por Kg de peso corpóreo de fumonisina B₁ por animal e os grupos “Pb” e “Pb+FB” receberam PBS estéril como controle.

Depois de 7 dias foi realizada a coleta do sangue total dos animais para a obtenção de soro, por punção cardíaca e posterior sacrifício por deslocamento cervical. O fígado e baço foram retirados assepticamente para análise histopatológica, ensaio de proliferação linfocitária e quantificação de NO liberado por células do baço, respectivamente. A dose e a via de administração da FB₁ foi baseada em um trabalho realizado por Johnson and Sharma (2001), entretanto ao

invés de sacrificar os animais após 24 horas após a inoculação como feito pelos autores os animais foram sacrificados após 7 dias.

3.4.7 Reação Imunoenzimática (ELISA) para Detecção de Anticorpos Anti-CFA

Imunoplasmas (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com 100 µl/orifício com uma solução contendo 30 µg de antígeno livre de célula (CFA) em tampão carbonato-bicarbonato de sódio pH 9,0, por 1 hora a 37°C e 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com tampão de lavagem (leite em pó desnatado 0,5% com Tween 20 em PBS 0,15M) e bloqueadas com tampão de bloqueio (leite em pó desnatado 5% com Tween 20 em solução PBS 0,15M), por 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas, sendo então adicionado 100 µL/orifício de amostra de soro de camundongos diluídas 1:10 em tampão de diluição (leite em pó desnatado diluído em PBS) em duplicata e incubadas por 1 hora a 37°C. Após lavagens, foi adicionado 100 µL/orifício de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A8924, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), diluído em tampão de diluição a 1:4000 e em seguida a placa foi incubada por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem foi adicionado 100 µL/orifício de solução reveladora, contendo tampão citrato, "ortho-phenylenediamine" (OPD) e peróxido de hidrogênio, e a reação foi interrompida após 15 minutos, com 50 µL de ácido sulfúrico 3N seguida de leitura da placa em aparelho Multiskan Reader à 492 nm.

3.4.8 Reação de Hipersensibilidade Tardia (DTH)

A reação de DTH foi realizada em todos os grupos de camundongos. Todos os grupos foram imunizados com ExoAg de Pb na pata traseira direita e PBS estéril na esquerda. Foi utilizado um paquímetro para medir o inchaço na pata inoculada e na pata controle. Através da altura da pata calculou-se a área da secção transversal a partir da fórmula $A=\pi D^2/4$, onde A é a área do círculo, o valor de π é 3,14 e D é a altura da pata. E a partir da relação entre a área da pata inoculada e a área da pata controle fez-se a comparação entre os grupos.

3.4.9 Ensaio de Linfoproliferação

O baço foi retirado assepticamente e macerado em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). A suspensão de células foi tratada com tampão de lise de hemácias, lavada 3 vezes em meio RPMI 1640 e a concentração ajustada para 2×10^6 células por mL. Amostras de 100 μL da suspensão foram incubadas com 7 μL de Concanavalina A (ConA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) ou ExoAg (7 mg/mL) de Pb ou meio de cultura como controle a 37°C em estufa de CO₂. A adição de timidina tritiada foi realizada 8 horas antes de se completar o período necessário do ensaio, na placa estimulada com ConA e com ExoAg após 3 e 5 dias, respectivamente. As células foram coletadas semi-automaticamente em filtro de fibra de vidro (Millipore Co., USA) que foi recortado e colocado em frasco de cintilação contendo 2,5 mL de líquido de cintilação miscível em água e levado para contagem em aparelho cintilador LS Analyzer Beckman. Os resultados foram expressos em índice de proliferação, obtido através da média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa estudada dividido pela média de leitura das triplicatas da resposta linfoproliferativa na ausência de estímulo, ambas em contagem por minuto.

3.4.10 Quantificação de NO

Amostras de 100 μL da suspensão de células esplênicas foram incubadas com 7 μL de LPS (Sigma) (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Após centrifugação à 200,35 g por 5 minutos o sobrenadante foi coletado e congelado à -20°C até o momento do uso. Uma alíquota de 50 μL de sobrenadante foi incubada v/v com reagente de Griess (sulfonilamida 1%, naftiletilenediamina dihidroclorido 0,1% e ácido fosfórico 2%) durante 10 minutos à temperatura ambiente seguida de leitura à 550 nm em leitor Multiskan Reader.

3.4.11 Reação de ELISA para Detecção de Gp43

Segundo Miura *et al.* (2001), Immunoplasmas (TPP, Switzerland), foram sensibilizadas com 100 μL /orifício de IgG de coelho anti-gp43, na concentração de 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluído em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,0 e incubadas por 1 hora a 37°C e 18 horas a 4°C. Em seguida as placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas com tampão de bloqueio, por 1 hora a temperatura ambiente.

As placas foram novamente lavadas, e adicionado em duplicata 100 μ L/orifício de amostra de soro de camundongos, diluídas 1:10 em tampão de diluição e incubadas por 1 hora a 37°C. Após 4 lavagens, foi adicionado 100 μ L/orifício de anticorpo monoclonal de camundongo anti-gp43, na concentração de 30 μ g/ml e novamente incubados por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem, e adição de 100 μ L/orifício de conjugado peroxidase anti-IgG de camundongo (A8924, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), diluído em tampão de diluição a 1:12000, a placa foi incubada novamente por 1 hora a 37°C. Após este passo, foi adicionado 100 μ L/orifício de solução reveladora, contendo tampão citrato, OPD, peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida após 15 minutos, com 50 μ L/orifício de ácido sulfúrico 3N seguida de leitura da placa em aparelho Multiskan Reader à 492 nm.

3.4.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey-Kramer, pelo programa GraphPad InStat version 3.05 for Windows 95/NT (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com). Os valores são descritos pela média \pm desvio padrão, e os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

3.5.1 Preparo do Extrato de Fumonisina

A figura 1A mostra o perfil cromatográfico do padrão de FB₁ (Sigma Chemical Co.), o tempo de retenção da FB₁ foi de 6,35 minutos, tempo semelhante ao da amostra de FB₁ parcialmente purificado de *F.verticillioides*, 6,288 minutos (Figura 1B). Através da análise da curva de calibração foi determinado a concentração de 167,05 mg/mL de FB₁ no extrato.

3.5.2 ELISA para Detecção de IgG Anti-CFA

Para a detecção de IgG anti-CFA no soro dos animais foi utilizada placa de ELISA sensibilizada com CFA de Pb18. A Figura 2 mostra maiores níveis de anticorpos anti-CFA nos animais infectados (Pb: 0,032 \pm 0,008; Pb+FB: 0,026

$\pm 0,005$) em relação aos não infectados (PBS: $0,015 \pm 0,005$; PBS+FB: $0,014 \pm 0,004$). Resultados significativos foram encontrados nos grupos infectados em relação aos não infectados, sendo $p < 0,001$ entre os grupos PBS e PBS+FB em relação ao Pb e $p < 0,05$ entre os grupos PBS e PBS+FB em relação ao Pb+FB.

3.5.3 Teste de DTH

A leitura do teste de DTH foi realizada 24 horas após inoculação através da relação das áreas de secção transversal das patas inoculadas com ExoAg e das patas controles. Os animais não infectados apresentaram menor resposta inflamatória que os animais infectados (PBS: $1,100 \pm 0,1672$; PBS+FB: $0,9805 \pm 0,084$; Pb: $1,595 \pm 0,1939$; Pb+FB: $1,497 \pm 0,091$). Resultados significativos foram observados entre os grupos infectados em relação aos não infectados, com nível de significância de $p < 0,001$ (Figura 3).

3.5.4 Estimulação da Proliferação Celular com Exoantígeno

A Figura 4 mostra que o índice de estimulação foi mais alto nos grupos infectados (Pb: $2,045 \pm 0,7126$; Pb+FB: $1,553 \pm 0,2613$) que nos não infectados (PBS: $1,107 \pm 0,2396$; PBS+FB: $0,8767 \pm 0,1560$). Resultados significativos foram encontrados entre os grupos PBS e Pb ($p < 0,01$), PBS+FB e Pb ($p < 0,001$) e PBS+FB e Pb+FB ($p < 0,05$).

3.5.5 Estimulação de Proliferação Celular com Mitógeno ConA

A estimulação com ConA (Figura 5) foi mais elevada nos grupos PBS ($1,957 \pm 0,4197$) e Pb ($1,528 \pm 0,2851$) do que nos grupos PBS+FB ($0,120 \pm 0,088$) e Pb+FB ($0,175 \pm 0,2403$). Entretanto, foram encontrados resultados significativos apenas entre o grupo PBS em relação ao PBS+FB e PBS em relação ao Pb+FB ($p < 0,001$ em ambos os casos).

3.5.6 Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

A quantificação de NO foi realizada de modo indireto através da Reação de Griess. O grupo PBS apresentou um aumento significativo em relação aos demais

grupos ($p < 0,001$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os três outros grupos (Figura 6).

3.5.7 ELISA de Detecção de Gp43

Para a detecção de gp43 no soro dos animais foi realizada ELISA de captura utilizando associação de IgG policlonal e monoclonal anti-gp43 e os resultados expressos em D.O. à 492 nm. Os resultados expressos em média: nos grupos PBS e PBS+FB, $0,2236 \pm 0,0206$ e $0,2940 \pm 0,0243$, respectivamente. E nos grupos Pb e Pb+FB, $0,3652 \pm 0,0285$ e $0,3716 \pm 0,032$, respectivamente (Figura 7). Houve diferença significativa entre grupos PBS versus PBS+FB ($p < 0,01$), PBS versus Pb ($p < 0,001$), PBS versus Pb+FB ($p < 0,001$), PBS+FB versus Pb ($p < 0,01$) e PBS+FB versus Pb+FB ($p < 0,01$).

DISCUSSÃO

No presente trabalho foi utilizado preparado CFA para a avaliação da resposta imune humoral específica e os resultados demonstraram aumento no nível de anticorpo nos grupos infectados, como esperado, todavia não houve diferença significativa em relação ao grupo infectado e tratado com a micotoxina.

Theumer *et al.* (2002) testaram a linfoproliferação de células mononucleares do baço com a administração de FB_1 e estimulação com LPS, estimulante de linfócitos B e não observaram diferenças entre as células estimuladas e as controle, sugerindo que a FB_1 não afeta a resposta imune humoral inespecífica. Por outro lado, Taranu *et al.* (2005) em estudos com porcos, demonstraram que animais alimentados com uma dieta contendo FB_1 têm menor nível de anticorpos contra *Mycoplasma agalactiae* após vacinação com o mesmo microrganismo. Assim, o nosso resultado não concordante com o trabalho acima pode ser devido à utilização de FB_1 parcialmente purificada, além da diferença na via de inoculação e principalmente de espécie animal e do agente infeccioso.

A resposta imune humoral não é considerada importante na PCM, sendo de fundamental importância a resposta celular, com ativação de linfócitos Th1 (Calich *et al.*, 1998, Cano *et al.*, 1998). Assim, o presente trabalho investigou a resposta celular específica “in vivo” por teste de DTH e “in vitro” por cultura de linfócitos.

Através do teste de DTH não foi observado diferença entre os grupos infectados e infectados e tratados com a micotoxina, bem como no teste “in vitro” utilizando as células esplênicas estimuladas com ExoAg, sugerindo que a micotoxina não afeta a resposta imune celular específica ao fungo, nas condições de estudo.

O estudo de resposta imune celular inespecífica “in vitro” por estimulação da proliferação celular de esplenócitos pelo mitógeno ConA demonstrou inibição significativa ($p < 0,001$) no grupo tratado com a micotoxina em relação ao grupo controle (PBS). Embora não significativo, pode-se notar um menor índice de proliferação entre o grupo Pb em relação ao PBS. O nosso resultado está de acordo com os dados de Theumer *et al.* (2002), que observaram inibição da proliferação de células esplênicas em camundongos tratados com FB₁ e estimuladas com mitógeno fitohemaglutinina (PHA).

Um outro ponto abordado neste trabalho foi a produção de NO por macrófagos do baço, uma vez que essas células desempenham papel crucial na defesa contra o Pb (Gonzalez *et al.*, 2000). A produção de citocinas Th1, como IFN- γ e TNF- α , induzem a produção de NO, por macrófagos, que tem atividade microbicida. Os resultados de nosso experimento demonstraram que macrófagos esplênicos dos animais controle quando estimulados com LPS liberaram uma maior quantidade de NO do que os macrófagos de animais infectados por Pb e/ou tratados com a FB₁, sugerindo que tanto o Pb quanto a micotoxina inibem a produção de NO por essas células. Em um experimento com macrófagos peritoneais, Nascimento *et al.* (2002) observaram aumento da produção de NO em macrófagos de camundongos infectados com Pb quando estimulados “in vitro” com o Pb. A diferença observada no nosso resultado possivelmente se deve ao agente estimulador, onde no lugar de Pb foi utilizado estimulador inespecífico, o LPS.

Neste trabalho foi realizada a avaliação do nível de gp43 solúvel, antígeno relevante de Pb, por ELISA, sendo observado nível sérico mais elevado no grupo infectado em relação ao grupo controle, confirmando a infecção. A infecção também foi confirmada por análise histológica de fígado (dado não mostrado), onde foi observada a presença de granulomas com leveduras de Pb nos animais infectados. Não foi observada diferença significativa entre o grupo infectado e tratado com a micotoxina do grupo infectado, sugerindo que nas condições do experimento a

micotoxina não afetou a gravidade da doença, considerando que o nível elevado está associado à gravidade da doença (da Silva *et al.*, 2003).

De forma surpreendente os animais não infectados e tratados apenas com a micotoxina demonstraram resultado positivo para gp43. Como os animais não entraram em contato com o fungo é possível que tenha ocorrido reação cruzada entre a gp43 e o extrato de fumonisinas, pois este é um material parcialmente purificado. Nesse experimento foi administrada apenas uma única dose de extrato de fumonisinas. Em muitos trabalhos com a FB₁ os autores a utilizam totalmente purificada e até mesmo por um período mais longo de administração. Todavia, para a melhor compreensão da ação da FB₁ no curso da PCM experimental são necessários mais estudos utilizando FB₁ purificada em diversas concentrações/doses e até mesmo por um período mais longo tanto de administração da FB₁, como também período mais abrangente de infecção.

Concluimos pelos resultados de avaliação de resposta imune celular que a micotoxina inoculada em uma dose única não afeta a resposta imune celular específica ao fungo Pb, todavia pode suprimir a resposta imune celular inespecífica.

Estudos adicionais são necessários para avaliar se a supressão inespecífica pode afetar a doença PCM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOTTA, M.H.S.L.; CAMARGO, Z.P., 1993. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 31(3):671-676.
- CALICH, V.L.; KASHINO, S.S., 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:615–623.
- CAMARGO, Z.P.; UNTERKIRCHER, C.; TRAVASSOS, L.R., 1989. Identification of antigenic polypeptides of *Paracoccidioides brasiliensis* by immunoblotting. *J Med Vet Mycol.* 2: 407-412.

- CANO, L.E.; KASHINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C.F.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; CALICH, V.L., 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 66:800–806.
- COLVIN, B.M.; HARRISON, L.R., 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia.* 117:79–82.
- DA SILVA, S.H.M.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A.L; BLOTTA, M.H.S.L.; LOPES, J.D.; CAMARGO, Z.P., 2004. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J. Clin. Microbiol.* 42(6):2419-2424.
- FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S., 2000. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 38:185-91.
- GLEDERBLOOM, W.C.A.; KRICK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G., 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis.* 12:1247–1251.
- GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A. & CANO, L.E., 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.* 68: 2546-2552.
- HOWARD, P.C.; EPPLEY, R.M.; STACK, M.E.; WARBRITTON, A.; VOSS, K.A.; LORENTZEN, R.J.; KOVACH, R.M.; BUCCI, T.J., 2001. Fumonisin B₁ carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect.* 2.:277–82.

- JOHNSON, V.J.; SHARMA, R.P., 2001. Gender-dependent immunosuppressive following subacute exposure to fumonisin B₁. *Int Immunopharmacol.* 1:2023-2034.
- LESLIE, J.F., 1996. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 392:153-164.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J., 1951. Colorimetric assays: Lowry's method for protein determination. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOOM, W.C.A.; COETZER, J.A.W.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, .J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *J Vet Res.* 55:197–203
- MCEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A., 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 25(3):165-175.
- MIURA, C.S.; ESTEVAO, D.; LOPES, J.D.; ITANO, E.N., 2001. Levels of specific antigen (gp43), specific antibodies, and antigen-antibody complexes in saliva and serum of paracoccidioidomycosis patients. *Med Mycol.* 39(5):423-428.
- NASCIMENTO, F.R.F.; CALICH, V.L.G.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M., 2002. Dual Role for Oxide Nitric in Paracoccidioidomycosis: Essencial for Resistance, but Overprocdution Associated with Susceptibility. *J Immunol.* 168:4593-4600.

- OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAORDANOU, P.M.O.; BLOTTA, M.H.S.L., 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes and Infect.* 4:139–144.
- ONO, E.Y.S.; KAWAMURA, O.; ONO, M.A.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y., 2000. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. *Food and Agricultural Immunology.* 12(1):5-14.
- ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E., OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; UENO, T.; HIROOKA, E.Y., 2001. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Addit Contam.* 18:719-729.
- SHEPARD, G.S.; SYDERNHAM, E.W.; THIEL, P.G.; GELDERBLOM, W.C.A., 1990. Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Liq Chromatogr.* 13(10):2077-2087.
- SYDERNHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R., 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, South Africa. *J Agric Food Chem.* 38:1900–1903.
- TARANU, I.; MARIN, D.E.; BOUHET, S.; PASCALE, F.; BAILLY, J.D.; MILLER J.D.; PINTON, P. OSWALD I.P., 2005. Mycotoxin fumonisin B₁ alters the cytokine

profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol Sci.* 84(2):301-7.

TARANU, I.; MARIN, D.E.; BOUHET, S.; PASCALE, E.; BAILLY, J.D.; OSWALD, I.P., 2006. *In vivo* and *in vitro* effects of fumonisin B₁ on cytokine production: implication for the immune response to vaccination. *Mycotoxins and Phycotoxins.* (1):157-167.

THEUMER, M.G.; LÓPES, A.G.; MASIH, D.T.; CHULZE, S.N.; RUBINSTEIN, H.R., 2002. Immunobiological effects of fumonisin B₁ in experimental subchronic mycotoxicosis in rats. *Clin. Diagn.Lab. Immunol.* 9(1):149-155.

UENO, Y.; AYOAMA, S.; SIGIURA, Y.; WANG, D-S.; HIROOKA, E.Y.; HARA, S; KARKI, T.; CHEN, G.; YU, S.H.A., 1993. A limited survey of fumonisin in corn and aorn-based products in Asian countries. *Mycotoxin Reaserch.* 9:27-34.

UENO, Y.; LIJIMA, K.; WANG, S.D.; SUGIURA, Y; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.Z., 1997. Fumonisin as a possible risk contributory factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol.* 35:1143–50.

WU, F., 2006. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory Impacts. *Transgenic Res.* 15:277–289.

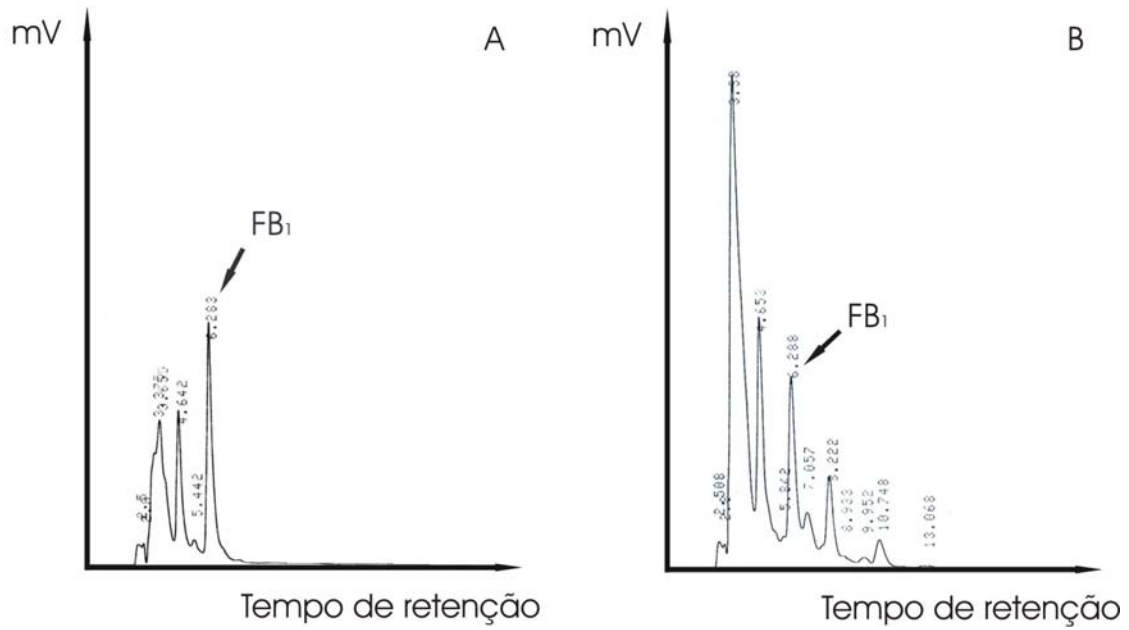


Figura 1. A) Perfil cromatográfico de padrão de FB₁; B) Perfil cromatográfico da FB₁ parcialmente purificada de extrato de *F. verticillioides*.

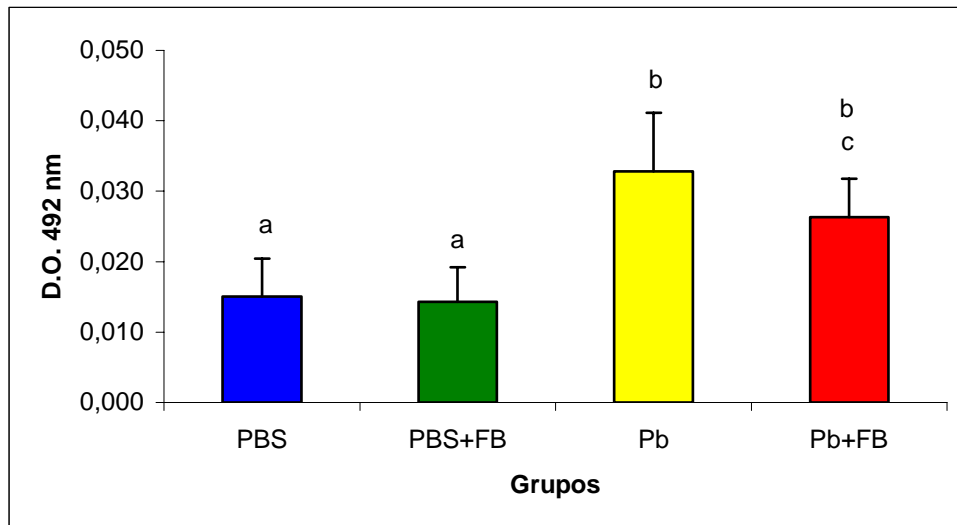


Figura 2. ELISA de detecção de anticorpos anti-CFA. A detecção de anticorpos anti-CFA foi feita com a sensibilização da placa com CFA de Pb. Resultados significativos mostram uma maior produção de anticorpos nos grupos Pb em relação aos grupos PBS e PBS+FB, Pb+FB em relação aos grupos PBS e PBS+FB, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente.

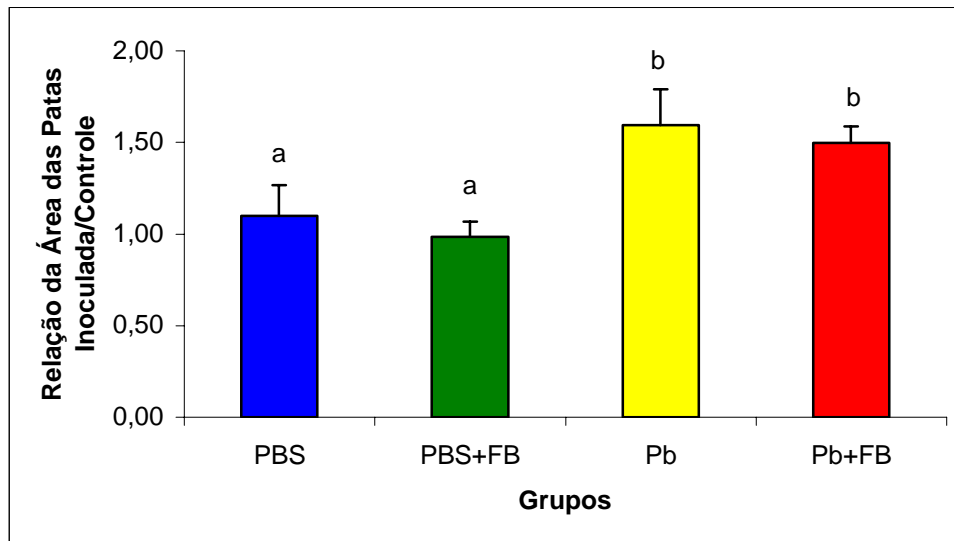


Figura 3. Teste de DTH. O teste de hipersensibilidade tardia foi realizado com a aplicação de exoantígeno de Pb na pata traseira dos animais, como controle foi administrado PBS estéril na outra pata. Os resultados mostram um aumento significativo na área de secção transversal dos animais infectados em relação aos não infectados, $p < 0,001$.

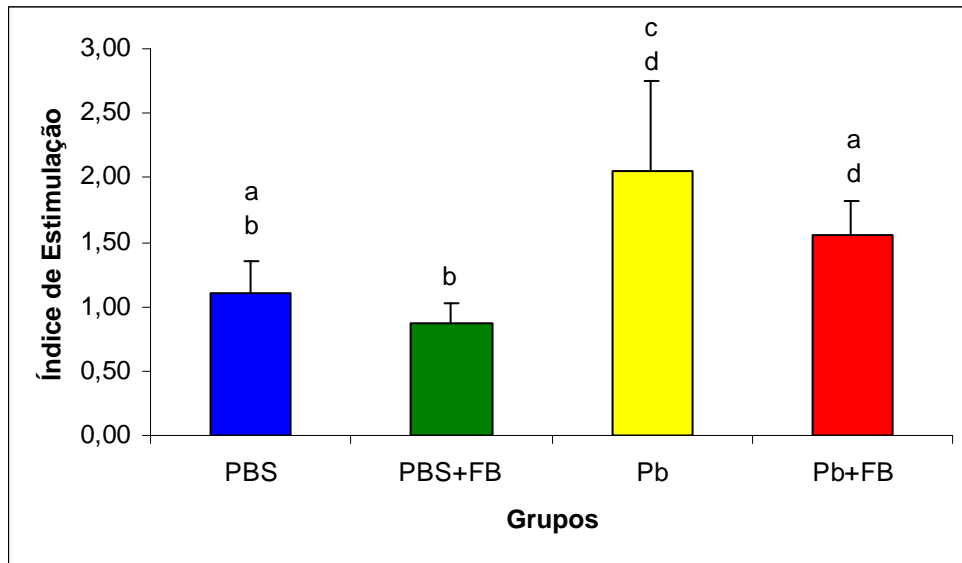


Figura 4. Estimulação da proliferação celular com exoantígeno. Células retiradas do baço foram estimuladas com exoantígeno de Pb. A figura mostra um aumento no índice de proliferação dos animais infectados em relação aos não infectados, resultados significativos foram observados em relação aos grupos PBS e Pb, PBS+FB e Pb, PBS+FB e Pb+FB ($p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,05$, respectivamente).

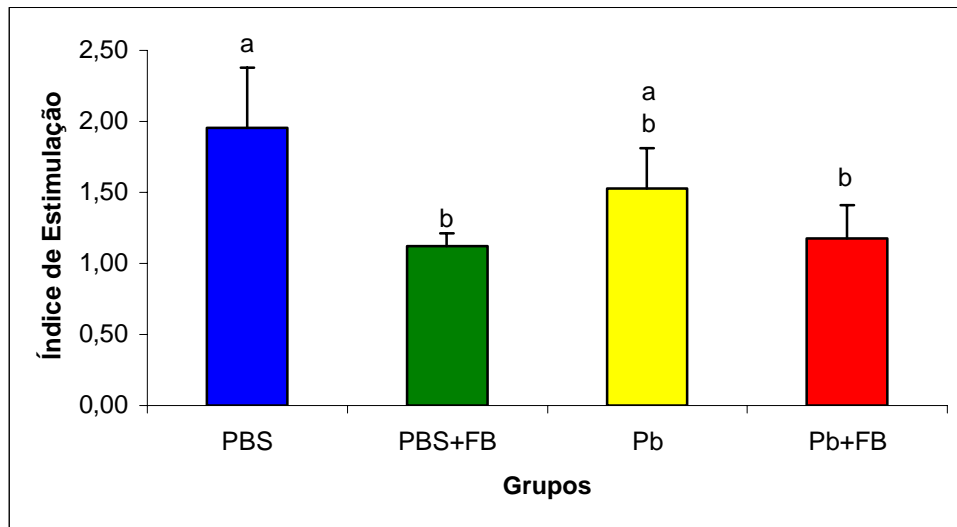


Figura 5. Estimulação da proliferação celular com ConA. Células esplênicas foram cultivadas com ConA para mensurar a proliferação celular. Ocorreu inibição da estimulação nos grupos tratados com FB_1 em relação ao grupo controle (PBS), $p < 0,001$.

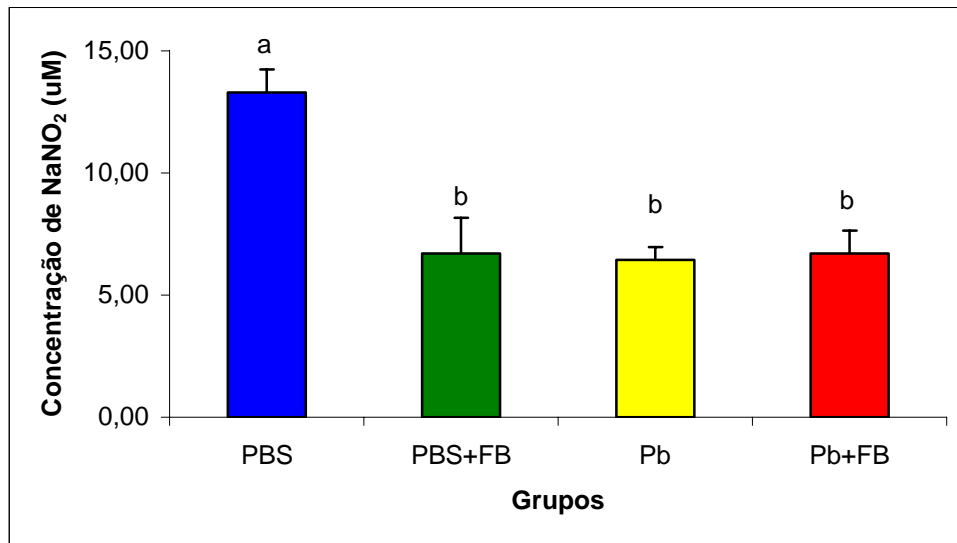


Figura 6. Quantificação da liberação de NO. Células do baço foram estimuladas com LPS para mensurar a liberação de NO no meio de cultura. A figura mostra a inibição da liberação de NO nos grupos infectados e tratados com FB em relação ao controle (PBS), $p < 0,001$.

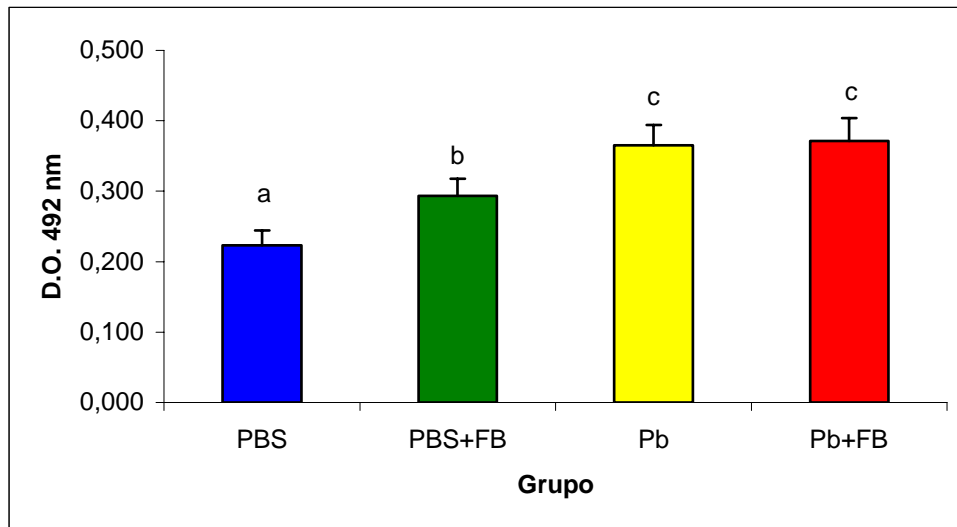


Figura 7. ELISA de detecção de gp43. A detecção de gp43 no soro dos animais realizou-se com a sensibilização da placa com IgG de coelho anti-gp43, depois adicionou-se nessa ordem o soro, anticorpo monoclonal anti-gp43 e conjugado peroxidase. A figura mostra um aumento significativo no nível de gp43 nos grupos PBS+FB, Pb e Pb+FB em relação ao grupo controle PBS, $p < 0,01$, $p < 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente.

REFERÊNCIAS

BAIDA, H.; BISELLI, P.J.C.; JUVENALE, M.; DEL NEGRO, G.M.B.; MENDES-GIANNINI, M.J.S.; DUARTE, A.J.S.; BERNARD, G., 1999. Differential antibody isotype expression to the major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. *Microbes Infect.* 1:273-278.

BLOTTA, M.H.S.L.; CAMARGO, Z.P., 1993. Immunological response to cell-free antigens of *Paracoccidioides brasiliensis*: relationship with clinical forms of paracoccidioidomycosis. *J. Clin. Microbiol.* 31(3):671-676.

BRUMMER, E.; CASTANEDA, E.; RESTREPO, A., 1993. Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clin Microbiol Rev.* 6(2):89-117.

CALICH, V.L.; KASHINO, S.S., 1998. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31:615–623.

CANO, L.E.; KASHINO, S.S.; ARRUDA, C.; ANDRE, D.; XIDIEH, C.F.; SINGER-VERMES, L.M.; VAZ, C.A.; BURGER, E.; CALICH, V.L., 1998. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. *Infect. Immun.* 66:800–806.

COLVIN, B.M.; HARRISON, L.R., 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia.* 117:79–82.

CUVILLIER, O.; PIRIANOV, G.; KLEUSER, B.; VANEK, P.G.; COSO, O.A.; GUTKIND, S.; SPIEGEL, S., 1996. Suppression of ceramide mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature.* 381:800–803.

DA SILVA, S.H.M.; QUEIROZ-TELLES, F.; COLOMBO, A.L; BLOTTA, M.H.S.L.; LOPES, J.D.; CAMARGO, Z.P., 2004. Monitoring gp43 antigenemia in paracoccidioidomycosis patients during therapy. *J. Clin. Microbiol.* 42(6):2419-2424.

DUGYALA, R.R.; SHARMA, R.P.; TSUNODA, M.; RILEY, R.T., 1998. Tumor necrosis factor-alpha as a contributor in fumonisin B₁ toxicity. *J Pharmacol Exp Ther.* 285:317–324.

FERRANTE, M.C.; MELI, R.; RASO, G.M.; ESPOSITO, E.; SEVERINO, L.; DI CARLO, G.; LUCISANO, A., 2002. Effect of fumonisin B₁ on structure and function of macrophage plasma membrane. *Toxicol Lett.* 129(3):181-187.

FRANCO, M.; BAGAGLI, E.; SCAPOLIO, S.; LACAZ, C.S., 2000. A critical analysis of isolation of *Paracoccidioides brasiliensis* from soil. *Med Mycol.* 38:185-91.

GELDERBLOM W.C.A.; JASKIEWICZ, K.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G.; HORAK, R.M.; VLEGGAAAR, R.; KRIEK, N.P.J., 1988. Fumonisins-Novel Mycotoxins with Cancer-Promoting Activity Produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl environ microbiol.* 54:1806-1811.

GELDERBLOOM, W.C.A.; KRICK, N.P.J.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G., 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis.* 12:1247-1251.

GONZALEZ, A.; GREGORI, W.; VELEZ, D.; RESTREPO, A. & CANO, L.E., 2000. Nitric oxide participation in the fungicidal mechanism of gamma interferon-activated murine macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis* conidia. *Infect. Immun.* 68: 2546-2552.

HANNUN, Y.A.; BELL, R.M., 1989. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science.* 243:500-507.

HEUNG, L.J.; LUBERTO, C.; DEL POETA, M., 2006. Role of Sphingolipids in Microbial Pathogenesis. *Infect. Immun.* 74(1):28-39.

HOWARD, P.C.; EPPLEY, R.M.; STACK, M.E.; WARBRITTON, A.; VOSS, K.A.; LORENTZEN, R.J.; KOVACH, R.M.; BUCCI, T.J., 2001. Fumonisin B₁ carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspect.* 2.:277-82.

JACKSON, L.S.; DEVRIES, J.W.; BULLERMAN, L.B., 1996. Fumonisins in Food. *Plenum Press.* 399.

JURGENSON, J.E.; ZELLER, K.A.; LESLIE, J.F., 2002. Expanded genetic map of *Gibberella moniliformis* (*Fusarium verticillioides*). *Appl environ microbiol.* 68(4):1972-1979.

LI, Y.C.; LEDOUX, D.R.; BERMUDEZ, A.J.; FRITSCHE, K.L.; ROTTINGHAUS, G.E., 1999. Effects of fumonisin B₁ on selected immune responses in broiler chicks. *Poult Sci.* 78:1275–1282.

MARASAS, W.F.O.; KELLERMAN, T.S.; GELDERBLOOM, W.C.A.; COETZER, J.A.W.; THIEL, P.G.; VAN DER LUGT, J.J., 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium moniliforme*. *J Vet Res.* 55:197–203

MARIJANOVIC, D.R.; HOLT, P.; NORRED, W.P.; BACON, C.W.; VOSS, K.A.; STANCEL, P.C., 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. *Poult Sci.* 70:1895–1901.

MARTINOVA, E.A.; MERRILL JR., A.H., 1995. Fumonisin B₁ alters sphingolipid Metabolism and immune function in BALB/c mice: immunological responses to fumonisin B₁. *Mycopathologia.* 130:163–170.

MCEWEN, J.G.; BEDOYA, V.; PATINO, M.M.; SALAZAR, M.E.; RESTREPO, A., 1987. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by the inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol.* 25(3):165-175.

MENDES-GIANNINI, M.J.S.; BUENO, J.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; FERREIRA, A.W.; MASUDA, A., 1989. Detection of 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidioidomycosis. *J Clin Microbiol.* 27(12):2842-2845.

MERRIL Jr., A.H.; WANG, E.; GILCHRIST, D.G.; RILEY, R.T., 1993. Fumonisin and others inhibitors of sphingolipid biosynthesis. In *Advances in Lipid Research; Sphingolipids and their Metabolites*, Bell, R.M.; Hanun, Y.A.; Merrill Jr., A.H. Ed. Academic Press, San Diego, CA. 215-234.

MUNKVOLD, G.P.; DESJARDINS, A.E., 1997. Fumonisin in maize: Can we reduced their occurrence? *Plant Disease.* 81:556-565.

OLIVEIRA, S.J.; MAMONI, R.L.; MUSATTI, C.C.; PAPAORDANOU, P.M.O.; BLOTTA, M.H.S.L., 2002. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect.* 4:139–144.

ONO, E.Y.S.; KAWAMURA, O.; ONO, M.A.; UENO, Y.; HIROOKA, E.Y., 2000. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Paraná, Brazil. *Food and Agricultural Immunology.* 12(1):5-14.

ONO, E.Y.S.; ONO, M.A.; FUNO, F.Y.; MEDINA, A.E., OLIVEIRA, T.C.R.M.; KAWAMURA, O.; UENO, T.; HIROOKA, E.Y., 2001. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Addit Contam.* 18:719-729.

PRIESCHL, E.E.; BAUMRUKER, T., 2000. Sphingolipids: second messengers, mediators and raft constituents in signaling. *Immunol Today.* 21:555–560.

QUANREN, H.; RILEY, R.T.; SHARMA, R.P., 2001. Fumonisin-induced tumor necrosis factor α expression in a porcine kidney cell line is independent of sphingoid base accumulation induced by ceramide synthase inhibition. *Toxicol Appl Pharmacol.* 174:69–77.

QURESHI, M.A.; GARLICH, J.D.; HAGLER JR., W.M.; WEINSTOCK, D., 1995. *Fusarium proliferatum* culture material alters several production and immune performance parameters in White Leghorn chickens. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 17: 791–804.

RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O.; VISMER, H.F., 2002. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol.* 68: 2101–2105.

SAKAI, T.; KOEZUKA, Y., 1998. Ceramide derivatives as therapeutic agents. *Exp Opin Ther Patents.* 8:1673–1682.

SANDOVAL, M.P.; DEL NEGRO, G.B.; MENDES-GIANNINI, M.J.S; BRITO, T., 1996. Distribution of exoantigens and 43 kDa glycoprotein (gp43) in yeast and mycelial forms of *Paracoccidioides brasiliensis*. *J. Mycol.* 6:1-6.

SCOTT, P.M., 1993. Fumonisin. *Inst J Microbiol.* 18:257-270.

SORIANO, J.M.; GONZÁLEZ L.; CATALÁ, A.I., 2005. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B₁. *Prog Lipid Res.* 44(6):345-356.

SYDERNHAM, E.W.; THIEL, P.G.; MARASAS, W.F.O.; SHEPHARD, G.S.; VAN SCHALKWYK, D.J.; KOCH, K.R., 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, South Africa. *J Agric Food Chem.* 38:1900–1903.

SYDENHAM E.W.; MARASAS, W.F.O.; THIEL, P.G., 1996. Determination of fumonisin in corn: evaluation of competitive immunoassay and HPLC techniques. *J Agric Food Chem.* 44(1):159-164.

TARANU, I.; MARIN, D.E.; BOUHET, S.; PASCALE, F.; BAILLY, J.D.; MILLER J.D.; PINTON, P. OSWALD I.P., 2005. Mycotoxin fumonisin B₁ alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol Sci.* 84(2):301-7.

TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P.; TABORDA, C.; RODRIGUES, E.G.; RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J.F.; ALMEIDA, I.C., 1995. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Arch Med Res.* 26:297–304.

TRYPHONAS, H.; BONDY, G.; MILLER, J.D.; LACROIX, F.; HODGEN, M.; MCGUIRE, P.; FERNIE, S.; MILLER, D.; HAYWARD, S., 1997. Effects of fumonisin B₁ on the immune system of Sprague–Dawley rats following a 14 day oral (gavage) exposure. *Fundam Appl Toxicol.* 39:53–59.

UENO, Y.; LIJIMA, K.; WANG, S.D.; SUGIURA, Y.; SEKIJIMA, M.; TANAKA, T.; CHEN, C.; YU, S.Z., 1997. Fumonisin as a possible risk contributory factor for primary liver cancer: a 3-year study of corn harvested in Haimen, China, by HPLC and ELISA. *Food Chem Toxicol.* 35:1143–50.

VISCONTI, A.; BOENKE, A., 1995. Improvement of the determination of fumonisins (FB₁ and FB₂) in maize and maize-based feeds. *European Commission BCR Information-Chemical Analysis*. Brussels, Belgium.

WU, F., 2006. Mycotoxin reduction in Bt corn: potential economic, health, and regulatory impacts. *Transgenic Res.* 15:277–289.

XIA, P.; WANG, L.; GAMBLE J.R.; VADAS, M.A., 1999. Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor- α inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 274:34499–34505.