

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
TESE DE DOUTORADO**

**EFEITOS DE MICOTOXINAS SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE
FRANGOS DE CORTE**

CLAUDIA LAUTERT

PORTO ALEGRE

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
TESE DE DOUTORADO**

**EFEITOS DE MICOTOXINAS SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE FRANGOS
DE CORTE**

Autor: **CLAUDIA LAUTERT**

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias.

Subárea: Micologia.

Orientador: **PROF. DR. LAERTE FERREIRO**

Co-orientador: **PROF. DR. JANIO MORAIS
SANTURIO**

PORTO ALEGRE

2015

Claudia Lautert

EFEITOS DE MICOTOXINAS SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE
FRANGOS DE CORTE

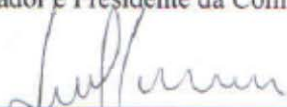
Aprovada em 27 de março de 2015

APROVADO POR



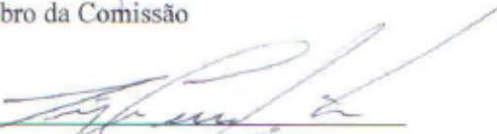
Prof. Dr. Laerte Ferreira

Orientador e Presidente da Comissão



Prof. Dr. Flávio de Mattos Oliveira

Membro da Comissão



Prof. Dr. Sérgio Ceroni da Silva

Membro da Comissão



Prof. Dr. Itabajara da Silva Vaz Jr.

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, aos meus pais, Claudio Roberto da Silva Lautert e Ivone Leda Lautert, pelo incentivo, apoio e amor incondicionais.

Ao professor e orientador, Laerte Ferreiro, pelos ensinamentos e dedicação à profissão. Ao professor e co-orientador, Janio Moraes Santurio, pela oportunidade de fazer parte da equipe LAPEMI e principalmente pelo voto de confiança, um verdadeiro obrigado.

Aos laboratórios e equipe do Setor de Micologia e LAPEMI: Amigos, colegas e companheiros de aprendizado.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV).

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

E por último, mas não menos importante, a Deus pela realização e concretização desta etapa...

“A maior prova da insanidade humana é fazer todos os dias as mesmas coisas e esperar resultados diferentes”.

-Albert Einstein-

RESUMO

Aves domésticas são um dos principais alvos da contaminação alimentar com micotoxinas. O que contribui para o aumento dos prejuízos da indústria avícola devido a problemas como: alta mortalidade, redução do ganho de peso, alteração da conversão alimentar, imunossupressão, anormalidades embrionárias e morte embrionária precoce. Além disso, o acúmulo residual de micotoxinas na carne é uma preocupação da Saúde Pública. Diversos métodos são utilizados para a avaliação da citotoxicidade induzida por agentes tóxicos, incluindo a inibição do crescimento celular, a avaliação da capacidade celular de sintetizar macromoléculas necessárias para a replicação e da capacidade desse agente tóxico para induzir a peroxidação lipídica. Sendo assim, o objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* de ocratoxina A, deoxinivalenol e zearalenona sobre o sistema imunológico de frangos de corte, utilizando como parâmetros, a viabilidade celular, a atividade enzimática e o estresse oxidativo. Realizou-se cultivo primário de linfócitos das aves e o seu isolamento através da técnica de centrifugação por gradiente de densidade. Cada micotoxina foi adicionada ao meio celular, em uma confluência de 80%, em diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL), analisando-se viabilidade celular, atividade de ecto-adenosina desaminase e acetilcolinesterase por ensaios colorimétricos e peroxidação lipídica através dos níveis de malondialdeído mensurados pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Todos esses parâmetros foram analisados em 24, 48 e 72 h, em triplicata e os resultados expressos como média e erro padrão da média, utilizando nível de significância $P < 0,05$. Os resultados obtidos demonstraram que tanto ocratoxina A como deoxinivalenol induziram proliferação linfocitária e baixa atividade de adenosina desaminase, enquanto zearalenona também induziu proliferação, mas nenhuma alteração na atividade da respectiva enzima. Quanto à avaliação da peroxidação lipídica, demonstrou-se a seguinte relação crescente de citotoxicidade: deoxynivalenol > ocratoxina A > zearalenona; enquanto que na avaliação da atividade de acetilcolinesterase esta relação foi inversamente proporcional. Este é o primeiro estudo *in vitro* realizado com ocratoxina A, deoxinivalenol e zearalenona sobre o cultivo primário de linfócitos de frangos de corte na avaliação desses parâmetros.

Palavras-chave: Micotoxinas, imunotoxicidade, citotoxicidade, frangos de corte.

ABSTRACT

Poultry is one of the main targets of food contamination with mycotoxins. This contributes to the increase in the poultry industry losses due to problems such as high mortality, reduced body weight gain, change in feed conversion, immunosuppression, embryonic abnormalities and early embryonic death. Furthermore, the residual accumulation of mycotoxins in the meat is a public health concern. Various methods are used to assess the cytotoxicity induced by toxic agents, including inhibition of cellular growth, the evaluation of cell ability to synthesize macromolecules necessary for replication and the ability of this toxic agent to induce lipid peroxidation. Thus, the general objective of this study was to evaluate the in vitro effects of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone on the immune system of broiler chickens using as parameters, cell viability, enzymatic activity and oxidative stress. It was realized a primary culture of lymphocytes of birds and their isolation through density gradient centrifugation technique. Each mycotoxin has been added to the cell medium, at 80% confluence, at different concentrations (0.001, 0.01, 0.1 and 1 µg/ mL), analyzing cell viability, ecto-adenosine deaminase and acetylcholinesterase activity by colorimetric assays and lipid peroxidation through the malondialdehyde levels measured by thiobarbituric acid-reactive species test. All these parameters were evaluated at 24, 48 and 72 h, in triplicate and the results expressed as mean and standard error of the mean, using $P < 0.05$ as significance level. The results showed that both ochratoxin A and deoxynivalenol induced lymphocyte proliferation and low adenosine deaminase activity, while zearalenone also induced proliferation, but no change in their enzyme activity. The assessment of lipid peroxidation demonstrated the following increasing cytotoxicity relation: deoxynivalenol > ochratoxin A > zearalenone; while in the evaluation of acetylcholinesterase activity this relationship was inversely proportional. This is the first in vitro study performed with ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone on the primary culture of broiler chicken lymphocytes evaluating these parameters.

Keywords: *Mycotoxins, immunotoxicity, cytotoxicity, broiler chickens.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Estrutura química de DON.....	20
FIGURA 2 - Metabólitos de OCRA.....	22
FIGURA 3 - Vias de detoxificação de ZEA e seus metabólitos.....	23
FIGURA 4 - Efeitos de ADA sobre nucleosídeos de adenina.....	27
FIGURA 5 – Etapas da peroxidação lipídica.....	31

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Limites Máximos Tolerados (LMT) das micotoxinas OCRA, DON e ZEA para aplicação em janeiro de 2014.....	16
TABELA 2 – Limites Máximos Tolerados (LMT) das micotoxinas DON e ZEA para aplicação em janeiro de 2016.....	16

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh- Acetilcolina.
- AChE- Acetilcolinesterase.
- AChRs- Receptores de acetilcolina.
- ADP- Adenosina difosfato.
- Ado- Adenosina.
- AdoRs- Receptores de adenosina.
- AFB₁- Aflatoxina B₁.
- AMP- Adenosina monofosfato.
- AMPC- Adenosina monofosfato cíclico.
- APCs- Células apresentadoras de antígenos.
- ATP- Adenosina trifosfato.
- Caco-2- Linhagem celular de carcinoma de cólon humano.
- cGMP- Monofosfato de guanosina cíclico.
- COX-2- Ciclo-oxigenase-2.
- dAdo- 2'-Deoxiadenosina.
- DC- Células dendríticas.
- DNA- Ácido desoxirribonucleico.
- DON- Deoxinivalenol.
- DMSO- Dimetilsulfóxido.
- E-ADA- Ecto-adenosina desaminase.
- EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético.
- E-NTPDase- Ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolase.
- EROs- Espécies reativas de oxigênio.
- GPx- Glutathione peroxidase.
- Gs- Proteínas G estimulatórias.
- HBSS- Solução salina balanceada de Hanks.
- HepG2- Linhagem celular de hepatocarcinoma humano.
- 4-HNE- 4-Hidroxinonenal.
- 3 α -HSD e 3 β -HSD- Enzimas hidroxisteróide desidrogenases.
- IgA- Imunoglobulina A.
- IgG- Imunoglobulina G.
- IgM-Imunoglobulina M.
- IL-2- Interleucina 2.

IP₃- Inositol-1,4,5-trifosfato.
LDH – Lactato desidrogenase.
NF-κB- Fator nuclear κB.
mAChR- Receptor muscarínico de acetilcolina.
MAPKs- Proteínas quinases ativadas por mitógenos.
MDA- Malondialdeído.
MMPs- Metaloproteinases de matriz.
MTT- 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina.
nAChR- Receptor nicotínico de acetilcolina.
NADH- Nicotinamida adenina dinucleótido hidreto.
NF-κB- Fator nuclear kappa B.
NK- Natural killer.
OAT- Proteínas transportadoras de ânion orgânico.
OCRA- Ocratoxina A.
OTA- Ocratoxina A.
PBMC- Células mononucleares do sangue periférico.
PBS- Phosphate buffered saline (tampão fosfato-salino).
PEPCK- Fosfoenolpiruvato carboxiquinase.
PLC- Fosfolipase-C.
PUFA- Ácidos graxos poli-insaturados.
RNA- Ácido ribonucleico.
ROS- Espécies reativas de oxigênio.
SFB- Soro fetal bovino.
SOD- Superóxido dismutase.
TBARS- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.
Th1- T helper 1.
Th2- T helper 2.
TLR- Receptor Toll-like.
TNF- Fator de necrose tumoral.
UDPGT- Uridina difosfato glicuroniltransferase.
ZAN- Zearalanona.
α-ZAL- α-Zearalenona.
β-ZAL- β-Zearalenona.
ZEA- Zearalenona.
α-ZOL- α-Zearalenol.

β -ZOL- β -Zearalenol.

ZON- Zearalenona.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	Micotoxinas	19
2.2	O Sistema Imune das Aves	24
2.3	Viabilidade Celular	25
2.4	Adenosina Desaminase	26
2.5	Acetilcolinesterase	28
2.6	Estresse Oxidativo	29
3	ARTIGO CIENTÍFICO	32
3.1	Manuscrito 1	33
3.2	Manuscrito 2	42
4	DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÕES	53
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
7	ANEXOS	67
7.1	Anexo A	69
7.2	Anexo B	71

1 INTRODUÇÃO

Há muitos séculos se conhece a toxicidade de certos fungos. Entretanto, somente em 1850, ao relacionar a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* com as características clínicas do ergotismo, foi levantada a possibilidade dos metabólitos secundários produzidos pelos fungos promoverem risco à saúde humana e animal (SANTURIO, 2000).

Ao contrário das micoses, micotoxicoses são exemplos de “envenenamento por meios naturais”, sendo análogas às patologias causadas pela exposição a pesticidas ou resíduos de metais pesados. Os sintomas de micotoxicoses dependem do tipo de micotoxina; quantidade e duração da exposição; a idade, saúde e sexo do indivíduo exposto; além dos efeitos sinérgicos envolvendo genética, estado alimentar e interações com outras toxinas (BENNETT & KLICH, 2003).

Micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários contaminantes de uma série de grãos e frutas pré ou pós-colheita. Aflatoxinas, deoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas, zearalenona, patulina e toxina T-2 são as mais importantes micotoxinas, as quais são caracteristicamente estáveis sob alterações nas condições ambientais e causadoras de diversos efeitos tóxicos em animais de laboratório, de produção e em humanos (CHEN et al., 2008).

Ocratoxina A (OCRA) é uma micotoxina de ocorrência natural produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em uma variedade de regiões geográficas e climáticas. Por ser um contaminante natural de frangos e alimentos estocados, são relatados muitos surtos de ocratoxicose (WANG et al., 2009). Estudos demonstram que OCRA causa efeitos prejudiciais tanto no crescimento (HUFF et al., 1988) quanto nas funções imunes de aves (AL-ANATI & PETZINGER, 2006). As toxinas provenientes do gênero *Fusarium*, deoxynivalenol (DON) e zearalenona (ZEA), também conhecidos como tricotecenos, são as principais em humanos e na nutrição animal devido sua frequência e ocorrência concomitante em concentrações toxicologicamente relevantes em grãos de cereais no mundo inteiro (GOYARTS et al., 2007).

Fatores que contribuem para a produção ou presença de micotoxinas em alimentos e rações incluem o armazenamento, condições ambientais e ecológicas, que na maioria das vezes, estão aquém do controle humano. Dentre os fatores que influenciam sua toxicidade estão a espécie, o modo de ação, o metabolismo e os mecanismos de defesa (HUSSEIN & BRASEL, 2001).

Apesar das inúmeras pesquisas e, conseqüentemente, maior compreensão a respeito de micotoxinas, elas ainda apresentam um acentuado e crescente impacto econômico, a nível mundial, através da mortalidade de animais de produção e domésticos e até mesmo do homem; da perda da produção forrageira e outras culturas agrícolas, e dos custos relacionados ao seu controle e pesquisas. Estima-se que cerca de 25% dos grãos e cereais em todo o mundo são contaminados por micotoxinas. O que demanda um controle e respectiva legislação sobre os limites aceitáveis de micotoxinas em alimentos e rações, que varia conforme a região ou país (HUSSEIN & BRASEL, 2001). No Brasil, o estabelecimento dos limites máximos tolerados de cada micotoxina, em variados produtos e seus derivados, é regularizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (Tabelas 1 e 2).

Um dos principais problemas decorrentes da presença de micotoxinas em produtos agrícolas é a possibilidade da contaminação dos produtos de alimentação animal, e subsequentemente, diminuição do desempenho e até mesmo a perda desses animais (PRELUSKY et al., 1994). Há uma grande preocupação em relação à influência negativa de micotoxinas sobre o desempenho de aves comerciais (WANG et al., 2012). O frango é o animal de produção mais numeroso no mundo, representando uma média de 50 bilhões de aves produzidas a cada ano. A fim de atender as questões de segurança alimentar, a produção de aves aumentará drasticamente nas próximas décadas. O intenso crescimento de países, como a China e a Índia, conduzirá, inevitavelmente, a um aumento do consumo de aves comerciais e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) prevê que o consumo de frango ultrapassará ao da carne vermelha nos EUA até 2018 (WU & KAISER, 2011).

O conhecimento a respeito dos mecanismos de ação das micotoxinas e suas rotas metabólicas são fundamentais para o desenvolvimento de estratégias de controle de micotoxicoses em espécies específicas (HUSSEIN & BRASEL, 2001). Inúmeros métodos são utilizados na avaliação da citotoxicidade induzida por agentes tóxicos, incluindo inibição do crescimento celular, capacidade celular de síntese de macromoléculas essenciais para a sua replicação e capacidade de indução de peroxidação lipídica pelo agente tóxico (ABID-ESSEFI et al., 2004). Ensaio de viabilidade celular são utilizados para mensuração de morte celular por injúria tóxica e do efeito interativo entre diversas micotoxinas em relação à função metabólica celular e atividade lisossomal. Testes de citotoxicidade são necessários para elucidar conhecimentos essenciais relacionados à genotoxicidade e peroxidação lipídica, para subsequentes avaliações de parâmetros *in vivo* (EISENBRAND et al., 2002).

A desvantagem no uso de linhagens celulares consiste na imortalização química ou genética das células, que predispõe à alteração das suas propriedades durante o cultivo de

longo prazo. Desta forma, linhagens celulares podem não refletir a mesma resposta de células normais, o que torna o cultivo primário uma opção mais adequada em estudos para a avaliação de efeitos citotóxicos associados à micotoxinas (KÖNIGS et al., 2007).

Tabela 1. Limites Máximos Tolerados (LMT) das micotoxinas OCRA, DON e ZEA para aplicação em janeiro de 2014.

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/Kg)
Ocratoxina A (OCRA)	Cereais para posterior processamento, incluindo grão de cevada.	20
	Trigo e milho em grãos para posterior processamento	3000
Deoxinivalenol (DON)	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1500
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	1250
Zearalenona (ZEA)	Milho em grão e trigo para posterior processamento	400

Fonte: Resolução da ANVISA RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 (Anexo III).

Tabela 2. Limites Máximos Tolerados (LMT) das micotoxinas DON e ZEA para aplicação em janeiro de 2016.

Micotoxinas	Alimento	LMT (µg/Kg)
	Trigo integral, trigo para quibe, farinha de trigo integral, farelo de trigo, farelo de arroz, grão de cevada.	1000
Deoxinivalenol (DON)	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	750
	Farinha de trigo, massas, crackers, biscoitos de água e sal, e produtos de panificação, cereais e produtos de cereais exceto trigo e incluindo cevada malteada.	100
Zearalenona (ZEA)	Arroz beneficiado e derivados.	100
	Arroz integral	400
	Farelo de arroz.	600
	Milho de pipoca, canjiquinha, canjica, produtos e sub-produtos à base de milho.	150
	Trigo integral, farinha de trigo integral, farelo de trigo.	200

Fonte: Resolução da ANVISA RDC Nº 7 de 18 de fevereiro de 2011 (Anexo IV).

Vários processos desempenham importante função em eventos moleculares relacionados a danos celulares, dentre eles, a inibição da síntese de macromoléculas celulares e indução da peroxidação lipídica através do estresse oxidativo. Define-se estresse oxidativo como um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes, o que resulta em potencial injúria celular (SIES, 1985), sendo a peroxidação lipídica uma das principais via celulares envolvidas nesse processo. A determinação de malondialdeído (MDA) é considerada excelente índice de peroxidação lipídica, já que MDA é um biomarcador final do estresse oxidativo e dano celular (VACA et al., 1988). A degradação lipídica e, conseqüentemente, a produção de MDA, altera a estrutura e função da membrana celular e bloqueia o metabolismo celular, ocasionando citotoxicidade (ENNAMANY et al., 1995). Além disso, o DNA é um dos principais alvos biológicos de estresse oxidativo (AMES, 1989); o que pode induzir danos genotóxicos, incluindo alterações das bases de DNA, formações de adutos (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1995) e carcinogênese (EL GHISSASSI et al., 1995).

Os alvos celulares dos tricotecenos, no sistema imune, incluem macrófagos e linfócitos (PESTKA, 2008). O principal efeito citotóxico dos tricotecenos é a inibição da síntese proteica através da ligação à subunidade 60s de ribossomos eucarióticos. Dentre outros efeitos, destacam-se inibição da síntese de DNA e RNA, inibição da função mitocondrial, efeitos sobre a divisão celular e integridade da membrana, e indução de apoptose (ROCHA et al., 2005). A citotoxicidade de DON tem sido estudada em diversas linhagens celulares ao longo dos últimos anos (CALVERT et al., 2005; CETIN & BULLERMAN, 2005; FORNELLI et al., 2004; LEWIS et al., 1999; KALAISELVI et al., 2013; KOUADIO et al., 2005; LI et al., 2014; MINERVINI et al., 2004; PESTKA et al., 2005; WIDESTRAND et al., 1999).

Macrófagos e linfócitos são alvos centrais de DON, que pode ser tanto imunoestimulatório quanto imunossupressivo, dependendo da dose, exposição e tempo do ensaio imune funcional (TIEMANN & DÄNICKE, 2007). Estudos em modelos animais e linhagens celulares comprovam que DON pode modular a função imune devido sua influência sobre as respostas pró-inflamatórias e a distribuição de leucócitos, e sua proliferação em diversos órgãos (COSTA et al., 2011). Da mesma forma, já foi relatado em estudos anteriores, o potencial efeito inibitório de OCRA sobre linfócitos T e B, bem como suas propriedades imunossupressivas (LEA et al., 1989). De acordo com estudos de MARIN et al. (1996), ERIKSEN & ALEXANDER (1998) e BEREK et al. (2001), diversas alterações dos parâmetros imunológicos de animais e humanos, como por exemplo a inibição da proliferação linfocitária, foram associadas à concentrações de ZEA *in vitro*.

Devido à grande importância econômica da avicultura para o Brasil são fundamentais pesquisas referentes à toxicologia, ocorrência, produção e controle de micotoxinas. Deste modo, experimentos *in vitro* ajudam a aprofundar os conhecimentos a respeito das interações destes metabólitos com as células de defesa do sistema imune de animais de produção, neste caso em específico, de frangos de corte.

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* de micotoxinas sobre o sistema imunológico de frangos de corte, utilizando como parâmetros, a viabilidade celular, a atividade enzimática e o estresse oxidativo. Dentre os objetivos específicos, destacam-se os seguintes:

- ✓ Avaliar a susceptibilidade das células linfocitárias de frangos de corte a diferentes concentrações de OCRA, DON e ZEA em relação à viabilidade celular e atividade de ecto-adenosina deaminase.

- ✓ Avaliar a susceptibilidade das células linfocitárias de frangos de corte a diferentes concentrações de OCRA, DON e ZEA em relação ao estresse oxidativo e atividade de acetilcolinesterase.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micotoxinas

As micotoxinas são contaminantes naturais de alimentos e rações, constituindo um problema de ordem mundial (WOOD, 1992). A história das micotoxinas começa em 1960, quando um inexplicável surto de mortalidade de aves ocorreu no Reino Unido. Este surto ficou conhecido mundialmente como “Doença X dos Perus”. Após investigação científica, descobriu-se que o problema estava na ração, produzida com amendoim importado da África e do Brasil, contaminado pela aflatoxina produzida por *Aspergillus flavus* (ALLCROFT & CARNAGHAN, 1962).

Os cereais, constituintes da dieta de aves, certamente são a principal fonte dessas toxinas para os animais, funcionando como substrato para o crescimento fúngico e consequente produção de micotoxinas. Porém, nem todo o cereal com presença de fungos está necessariamente contaminado por micotoxinas, uma vez que a produção e a concentração dessas substâncias são determinadas por efeitos associados às espécies de fungos presentes, temperatura e umidade do grão (RAMAKRISHNA et al., 1996).

Mais de quatrocentas micotoxinas são conhecidas na atualidade e produzidas por aproximadamente uma centena de fungos. As principais micotoxinas podem ser divididas em três grandes grupos: as aflatoxinas, produzidas por fungos do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* e *A. parasiticus*; as ocratoxinas, produzidas pelo *Aspergillus ochraceus* e diversas espécies do gênero *Penicillium*; e as fusariotoxinas, que possuem como principais representantes os tricotecenos, ZEA e as fumonisinas, produzidas por diversas espécies do gênero *Fusarium* (PINTO & VAAMONDE, 1996).

DON, também conhecida como vomitoxina, é uma micotoxina produzida por espécies de *Fusarium*, sendo considerada um dos mais importantes tricotecenos encontrados em todos os tipos de grãos, como trigo, centeio, cevada e aveia. Temperaturas baixas e alta umidade são condições ambientais que favorecem o desenvolvimento do fungo no campo, embora após a colheita, também possa ocorrer a infecção de grãos em casos de condições de armazenamento inadequadas, como elevada umidade. O que pode ser constatado através do amadurecimento prematuro e desigual dos grãos, assim como, sua apresentação em coloração rosa na colheita. No entanto, a otimização das condições de armazenamento (<14% de umidade) minimiza a produção da micotoxina (DERSJANT-LI et al., 2003). A estrutura química de DON (Figura 1) é estável e resiste a baixos níveis de pH, o que a torna um contaminante natural de dietas de humanos e animais, incluindo aves (ERIKSEN et al., 2003). A ocorrência natural de DON em grãos usados para a alimentação de aves é normalmente entre 0 e 5 mg/Kg, embora as concentrações possam ser superiores (DERSJANT-LI et al., 2003).

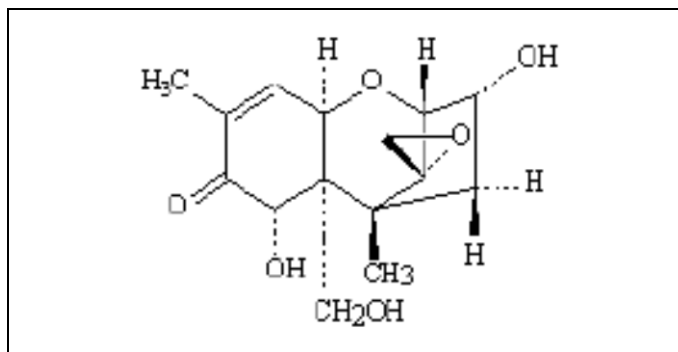


FIGURA 1- Estrutura química de DON.
 FONTE: HUSSEIN & BRASEL, 2001.

Os impactos adversos de DON sobre a função imune são descritos em cobaias, suínos, aves e modelos de culturas celulares. Entretanto, não está totalmente elucidado como DON modula as respostas imunes, apenas sabe-se que ela altera a viabilidade e proliferação de células imunes, resultando na inibição da biosíntese proteica e alteração da produção de citocinas pró-inflamatórias (DESJARDINS, 2006; OSWALD et al., 2005). O impacto de DON sobre a função imune varia de imunossupressão à imunoestimulação, de acordo com sua concentração, duração e tempo de exposição (BONDY & PESTKA, 2000). Baixas concentrações de DON (inferior a 5 mg/Kg de ração) parecem ser responsáveis pela estimulação da imunidade, enquanto altas concentrações parecem suprimir a resposta imune (PESTKA, 2003). Intoxicação crônica de DON por altas concentrações induz lesões e ativa a divisão de celular de órgãos do sistema imune e mucosa do trato gastrointestinal (DESJARDINS, 2006).

Tal como ocorre em outros tricotecenos, a biosíntese de proteínas é inibida por DON. A micotoxina se liga à subunidade 60S dos ribossomos, o que induz uma resposta de estresse e a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), devido alterações conformacionais do ribossomo que afetam a atividade de peptidil transferase. Após a indução de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), os níveis de prostaglandinas se elevam. Alta expressão de fator nuclear κ B (NF- κ B) induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, afetando as reações imunológicas em animais (ROCHA et al., 2005). A literatura a respeito do impacto da alimentação contaminada com DON sobre a saúde e desempenho em aves é contraditória (ERIKSEN & PETTERSSON, 2004), entretanto há um consenso sobre a predisposição a doenças infecciosas em aves expostas a dietas com DON (DÄNICKE et al., 2002; OSWALD et al., 2005; GHAREEB et al., 2012).

OCRA é uma micotoxina produzida naturalmente pelos fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em uma grande variedade de climas e regiões geográficas.

Como OCRA é um contaminante natural de rações de aves e bovinos, são relatados muitos surtos. Estudos demonstram que OCRA causa efeitos adversos sobre o estado sanitário de aves de produção, afetando a função imunológica, através da redução do tamanho dos órgãos constituintes deste sistema, como timo, baço e gânglios linfáticos, bem como, das células que compõem estes tecidos (AL-ANATI & PETZINGER, 2006).

OCRA é composto por uma porção de para-clorofenólico contendo um grupo dihidroisocumarínico ligado, através do seu grupo carboxi-7, à β -L-fenilalanina. Ela é rapidamente absorvida no estômago e intestino delgado em roedores. A absorção no duodeno pode ocorrer contra um gradiente de concentração, destacando a presença de proteínas transportadoras de ânion orgânico (OAT). Após a absorção, a concentração da toxina e seus metabólitos dependem de uma série de fatores, que incluem dose, via e duração da administração, além de fatores espécie-específicos como meia-vida e o grau de ligação no soro. A circulação entero-hepática também parece influenciar a cinética de OCRA, assim como a reabsorção da micotoxina pelo rim, ocasionando a persistência da toxina residual e, conseqüentemente, toxicidade renal (POHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007).

O efeito citotóxico mais relevante de OCRA é a inibição da síntese de proteínas, embora também se destaquem outros efeitos importantes como a peroxidação lipídica e alterações do DNA (RINGOT et al., 2006), que podem causar mutagenicidade celular (PALMA et al., 2007). Também há evidências de que tenha um papel genotóxico carcinogênico devido à indução de oxidação ao DNA, associada à ligação covalente entre os seus metabólitos reativos (Figura 2) e o DNA danificado (POHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007).

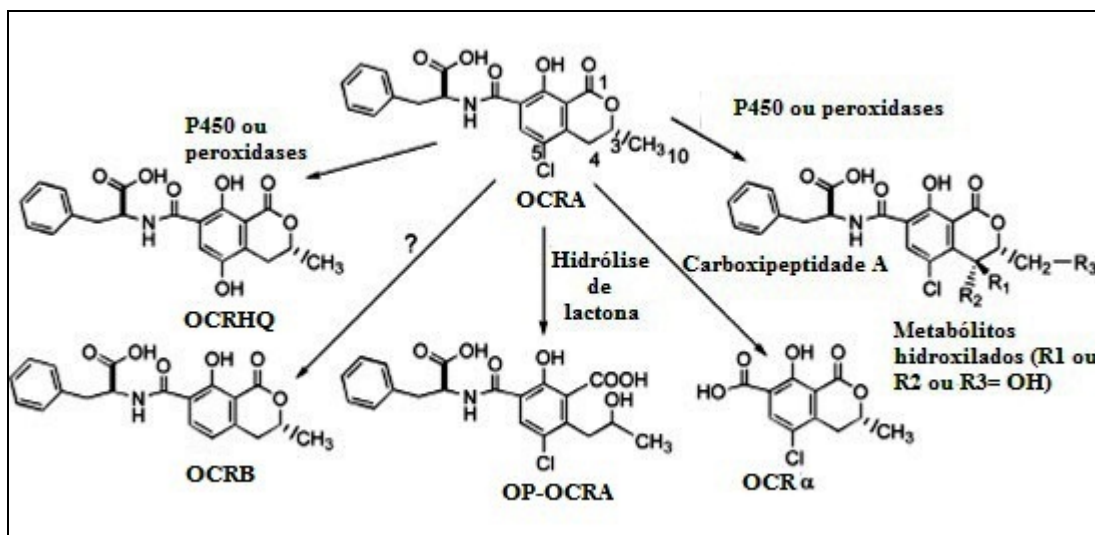


FIGURA 2- Metabólitos de OCRA.

FONTE: PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007.

Efeitos tóxicos de OCRA em aves são notificados desde a década de 60 (VAN DER MERWE et al., 1965), e tais efeitos diferem conforme as espécies de aves (BURDITT et al., 1984). O primeiro surto de ocratoxicose em perus, galinhas poedeiras e frangos de corte foi descrito por HAMILTON et al. (1982). Os principais sinais observados em perus foram alta mortalidade, nefrotoxicidade e inapetência. A redução do índice de conversão alimentar, nefropatia e aerosaculite foram relatados em frangos de corte; enquanto que nefropatia, redução da postura e da qualidade dos ovos foram associados às galinhas poedeiras. Aves são menos sensíveis à OCRA em relação aos suínos, provavelmente devido a sua maior capacidade de excretar a micotoxina comparadas a outras espécies (GALTIER et al., 1981), mesmo assim, a contaminação alimentar com OCRA afeta negativamente o desenvolvimento de aves.

ZEA é um metabólito secundário biosintetizado por diversas cepas de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* e *F. crookwellense*). É um estrógeno não-esteroidal, ou micoestrógeno, também denominado fitoestrógeno, contaminante comum de cereais em todo o mundo (BENNETT E KLICH, 2003). Em seu metabolismo predomina a conjugação, através de rotas de detoxificação, e reações de redução, através de ativação biológica (DUCA et al., 2010). Ela é reduzida por hidroxilação em α -zearealenol (α -ZOL), β -zearealenol (β -ZOL), zearealanona (ZAN), α -zearealenona (α -ZAL) e β -zearealenona (β -ZAL) (Figura 3). Estes metabólitos são conjugados com ácido sulfônico ou glicurônico, sendo eliminados na urina (ZINEDINE et al., 2007).

ZEA é uma lactona macrocíclica com uma alta afinidade de ligação com receptores de estrogênio, causando alterações no sistema reprodutivo de cobaias e animais de produção. O mecanismo dos efeitos estrogênicos de ZEA parece ser mediado através da sua ligação com receptores de estrogênio citoplasmáticos, ocasionando proliferação celular, e consequentemente, hiperplasia uterina, metaplasia cervical e vaginal. O sistema imune é um alvo em potencial para desreguladores endócrinos estrogênicos, já que muitas células deste sistema possuem receptores de estrogênio. Contudo, poucos estudos são realizados a respeito dos efeitos de ZEA sobre a imunidade de frangos, e mais especificamente sobre os linfócitos (WANG et al., 2012).

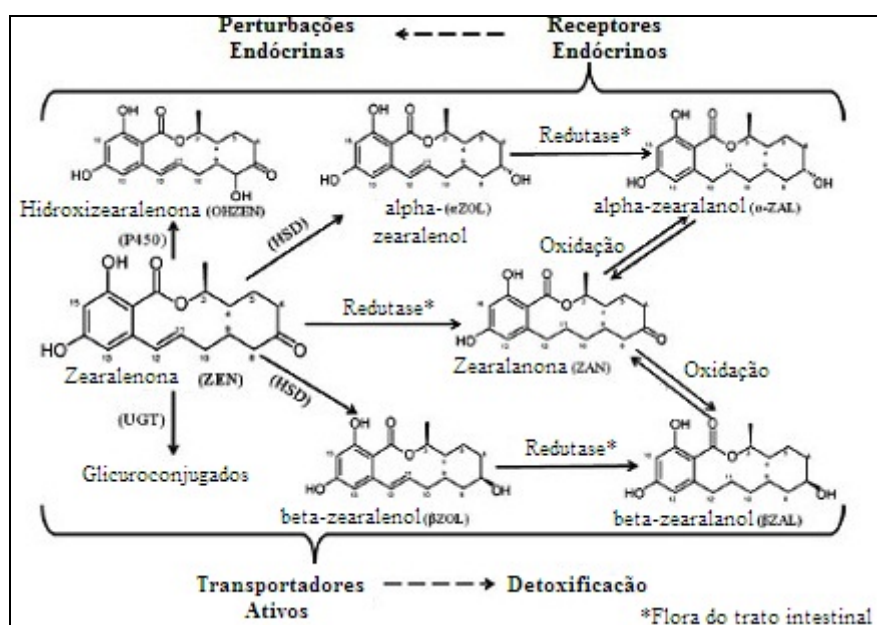


FIGURA 3- Vias de detoxificação de ZEA e seus metabólitos.
 FONTE: DUCA et al., 2010.

ZEA também é considerada hepatotóxica por estar associada a alterações dos parâmetros hematológicos e imunológicos no homem e em roedores (ABID-ESSEFI et al., 2004; HASSEN et al., 2007). ZEA exerce diversos efeitos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* (ABID-ESSEFI et al., 2004; CETIN & BULLERMAN, 2005; KOUADIO et al., 2005; HASSEN et al., 2007; BOUAZIZ et al., 2008), promovendo peroxidação lipídica, morte celular e inibição das sínteses proteica e de DNA (ABID-ESSEFI et al., 2004; KOUADIO et al., 2005; HASSEN et al., 2007; BOUAZIZ et al., 2008).

2.2 O Sistema Imune das Aves

O sistema imune é constituído por dois sistemas distintos e interativos: inato e o adaptativo. A resposta inespecífica inata compreende quatro barreiras de defesa: física, fisiológica, inflamatória e fagocítica. Uma vez rompidas estas barreiras iniciais, os micro-organismos penetram no local infectado, desencadeiam um processo inflamatório envolvendo vários eventos vasculares e celulares (LEKSTROM-HIMES & GALLIN, 2000). Estes eventos são iniciados por uma série de mediadores químicos que podem ser produzidos pelos micro-organismos invasores ou pelos leucócitos que participam desta resposta. Entre estes mediadores estão os componentes de quatro cascatas enzimáticas: sistema complemento, sistema de coagulação, fibrinolítico e das cininas, que contribuem para a eliminação dos micro-organismos invasores (RANG et al., 2001).

A imunidade específica é subdividida em imunidade mediada por células e humoral. A imunidade mediada por células, também conhecida como imunidade celular, é mediada pelos linfócitos T e se caracteriza pela defesa contra micro-organismos intracelulares. Enquanto que a imunidade humoral é mediada por anticorpos, que são produzidos pelos linfócitos B, e se caracteriza por ser um mecanismo de defesa atuante sobre micro-organismos extracelulares e suas toxinas (ABBAS et al., 2007).

As células do sistema imunológico das aves dividem-se, de acordo com a morfologia nuclear. Os agranulócitos são constituídos por linfócitos, macrófagos, monócitos e trombócitos. Os granulócitos são constituídos por heterófilos, basófilos e mastócitos. A morfologia dos granulócitos varia de acordo com as espécies aviárias (MORGULIS, 2002).

Embora os princípios básicos da resposta imune permaneçam constantes para todas as espécies de vertebrados estudadas, o frango tem um repertório diferente de genes, moléculas, células e tecidos em comparação com os mamíferos. Um exemplo é a ausência de linfonodos, que se caracterizam pelo principal sítio de apresentação de antígenos em mamíferos. Diversos tipos celulares têm a função de fagocitose no frango, incluindo macrófagos, células dendríticas (DC), heterófilos (o equivalente funcional dos neutrófilos de mamíferos) e trombócitos (homólogos às plaquetas, também ausentes em frangos) (WU & KAISER, 2011). Além disso, não possuem eosinófilos, e seus receptores Toll-Like (TLR) e de quimiocinas também divergem dos mamíferos (KAISER, 2010).

A complexidade do sistema imune está diretamente relacionada com uma imensa diversidade de métodos pelos quais sua função pode ser avaliada. A literatura é rica em exemplos de como as micotoxinas comprometem a função imunológica, no entanto, as

diversas abordagens quantitativas disponíveis dificultam a comparação entre os estudos e a avaliação de sua importância como agentes imunossupressores.

2.3 Viabilidade Celular

Ao longo das últimas décadas, diversos sistemas *in vitro* empregando o uso de culturas celulares têm sido desenvolvidos, evitando o uso excessivo de animais de laboratório, o que demanda custo e tempo, além de envolver questões éticas. Ensaio de culturas celulares podem ser utilizados para a avaliação preliminar da toxicidade de micotoxinas, bem como, das relações estrutura-atividade, elucidando os modos de ação das toxinas nas organelas celulares em nível bioquímico, além de serem utilizados como marcadores de toxicidade (CETIN & BULLERMAN, 2005).

Inúmeras linhagens celulares são utilizadas em estudos de citotoxicidade para avaliar a ação de micotoxinas (ROBB et al., 1990). Ensaio de citotoxicidade *in vitro* proporcionam eficaz e sensível “screening” de micotoxinas. O efeito de micotoxinas sobre culturas de células pode ser analisado pela determinação de diferentes parâmetros, tais como, atividade metabólica, danos na membrana plasmática, síntese de DNA e proteína. Efeitos citotóxicos podem ser avaliados através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difeniltetrazolium brometo) (WIDESTRAND et al., 1999).

O bioensaio de MTT é um teste alternativo para mensuração da replicação de DNA baseado na incorporação de ³H-timidina, evitando o manuseio de materiais radioativos (CETIN & BULLERMAN, 2005). Este método tem sido amplamente utilizado para avaliar a citotoxicidade de DON, ZEA e OCRA (BOUAZIZ et al., 2013; CLARKE et al., 2014; FERRER et al., 2009; MAENETJE et al., 2008; WANG et al., 2014), desde o seu desenvolvimento por MOSMANN (1983). O ensaio de MTT oferece uma relação linear entre o número de células e a produção de formazan em baixas e altas concentrações celulares, quantificando a viabilidade e proliferação celular (LEWIS et al., 1999).

MTT é um reagente salino de coloração amarela que é reduzido a cristais púrpuros escuros de formazan pela ação de enzimas mitocondriais em células viáveis. Alterações na integridade da membrana plasmática podem ser determinadas pela quantificação de enzimas intracelulares liberadas nos meios de culturas pelas células danificadas (LEWIS et al., 2009). A atividade de enzimas mitocondriais é usada como um indicador de viabilidade celular no ensaio de MTT, através da atividade de succinato desidrogenase (FERRER et al., 2009)

MTT é um método colorimétrico rápido, versátil, quantitativo e altamente reproduzível. CHAROENPORNSOOK et al. (1998) relataram que o bioensaio MTT tem

menor sensibilidade do que o ensaio de lactato desidrogenase (LDH) em relação à análise de citotoxicidade de fusariotoxinas. Entretanto, bioensaios de MTT demonstraram uma melhor correlação com ensaios *in vivo* do que o método LDH (FALLER ET AL., 2002).

2.4 Adenosina Desaminase

O sistema de sinalização purinérgico desempenha uma importante função na modulação das respostas inflamatória e imune pela ação de biomoléculas extracelulares como nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e seus derivados nucleosídeos de adenosina (Ado) (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Há evidências de que o ATP extracelular age em receptores da superfície celular específicos como agente pró-inflamatório, potencializando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BOURS et al., 2006) a partir de linfócitos T ativados (LANGSTON et al., 2003). Seu produto de decomposição, Ado, possui potente ação anti-inflamatória e imunossupressiva através da inibição da proliferação de células T e da secreção de citocinas (DEAGLIO et al., 2007; GESSI et al., 2007).

ATP extracelular e Ado são controlados por ecto-enzimas como as ecto-nucleosídeo trifosfato difosfohidrolases (E-NTPDase; CD39; EC 3.6.1.5) e ecto-adenosina desaminase (E-ADA; EC 3.5.4.4), as quais são ancoradas na superfície celular com seus sítios ativos em contato com o meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (International Union of Biochemistry and Molecular Biology), a Comissão de Enzimas estabelece a padronização da identificação enzimática que caracteriza exatamente cada enzima. Para a adenosina desaminase (ADA), essa designação significa: E.C. (enzyme commission) 3 – hidrolase; E.C 3.5 – age nas ligações C-N; E.C 3.5.4 – em amidinas cíclicas; E.C 3.5.4.4 – Adenosina Deaminase. Essa designação é usada internacionalmente na identificação enzimática (GORGUNER et al., 2000).

ADA é uma enzima essencial para o metabolismo de purinas que catalisa a desaminação hidrolítica de adenosina (Ado, I) e 2'-deoxiadenosina (dAdo, II) em inosina (III) e 2'-deoxiinosina (IV) (CRISTALLI et al., 2001) (Figura 4), presente em todos os tipos celulares, apresentando alta atividade no timo, tecidos linfóides e linfócitos periféricos. ADA pode ser expressa como ecto-enzima na superfície de linfócitos, desempenhando função essencial sobre o crescimento, diferenciação e proliferação de linfócitos T (CODERO et al., 2001; FRANCO et al., 1997).

A atividade de E-ADA diminui os níveis de Ado disponíveis para a estimulação de receptores de adenosina (AdoRs) expressos sobre a superfície de células T, mecanismo que contribui para a regulação do sistema imune (HASHIKAWA et al., 2004).

Ado é um regulador do metabolismo celular e ativador de uma série de efeitos fisiológicos, participando de eventos celulares como apoptose, necrose e proliferação (BURNSTOCK, 2006; DESROSIERS et al., 2007). Também é um regulador endógeno da imunidade inata, protegendo o hospedeiro de intensa lesão tecidual associada com acentuada inflamação (DESROSIERS et al., 2007). Ado age como um sensor, fornecendo informação ao sistema imune em relação à lesão tecidual ou alterações inflamatórias agudas (KUMAR & SHARMA, 2009).

Ado estimula receptores A2 acoplados a proteínas G estimulatórias (Gs), o que suprime as respostas celulares regulando positivamente os níveis intracelulares de AMP cíclico (AMPC). Desta forma, a sinalização de receptores A2 mediados por Ado podem regular negativamente as funções efetoras de neutrófilos, estimular a capacidade estimulatória de células Th2 das células dendríticas e inibir a atividade de linfócitos (BOURS et al., 2006). Portanto, Ado em altas concentrações pode agir sobre receptores purinérgicos, atenuando inflamação e lesão tecidual (DESROSIERS et al., 2007).

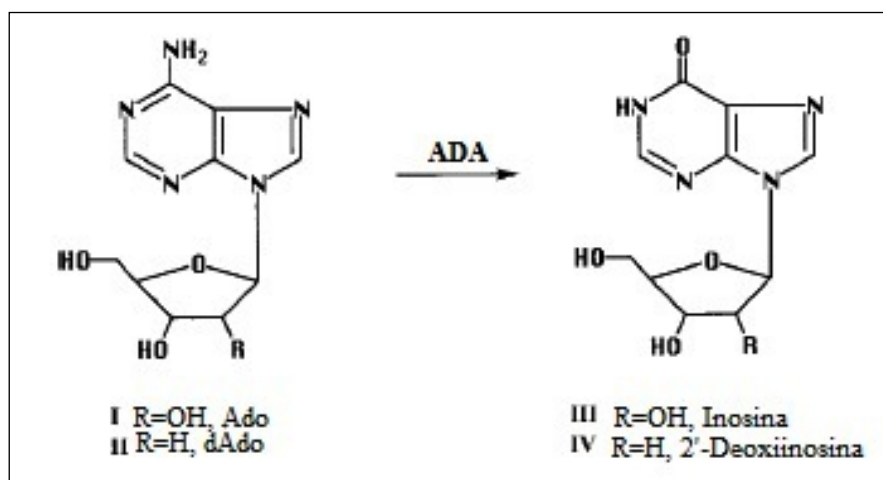


FIGURA 4- Efeitos de ADA sobre nucleosídeos de adenina.
 FONTE: CRISTALI et al., 2001.

ADA é uma enzima ubíqua, solúvel e globular, encontrada no citosol e na superfície de muitos tipos celulares da maioria dos vertebrados. Apresenta um papel importante no sistema imune, relacionada diretamente com a ativação de linfócitos T e macrófagos (FRANCO et al., 1997). Muitos estudos demonstram que elevados níveis de Ado e dAdo são

citotóxicos a determinados tipos celulares, sugerindo uma importante contribuição de ADA para a manutenção de adequadas concentrações celulares de nucleosídeo de adenina e nucleotídeos (GEIGER & NAGY, 1986)

Além de ser uma enzima chave no metabolismo de purinas nucleotídeos (FRANCO et al., 1997), ADA também está relacionada ao metabolismo de DNA, sendo um indicador de oxidação de DNA. O aumento da atividade de DNA demonstra dano oxidativo. Vários estudos demonstram que a atividade de ADA está relacionada à produção de radicais livres (KÖSE et al., 2001; YONEYAMA et al., 2002)

2.5 Acetilcolinesterase

Os sistemas nervoso e imune se comunicam bidirecionalmente, e os tecidos linfóides são inervados pelo sistema nervoso autônomo (BLALOCK, 1994). Células do sistema imune apresentam a maioria dos componentes do sistema colinérgico, incluindo colina acetiltransferase, transportadores de colina e acetilcolinesterase (AChE), além de produzirem acetilcolina (ACh) (KAWASHIMA & FUJII, 2004). ACh é amplamente conhecida como um neurotransmissor clássico, presente no sistema nervoso central e periférico, mas também é encontrada em linfócitos T, sendo sintetizada pela colina acetiltransferase (KAMIMURA et al., 2003).

O fato de ACh estar presente em bactérias, algas, protozoários, fungos, plantas e em células não-neuronais de vertebrados, altera sua função de somente um neurotransmissor. ACh pode estimular a atividade de células do sistema imune como linfócitos e, conseqüentemente, modular os mecanismos de defesa do hospedeiro. ACh não-neuronal está envolvida no sistema de defesa inespecífico (superfícies epiteliais, secreção mucosa, migração e fagocitose) e específico, além da modulação de processos inflamatórios. ACh e seus receptores são encontrados na maioria dos componentes do sistema imune: linfócitos ($CD4^+ > CD8^+$ células B), monócitos, granulócitos, macrófagos, mastócitos, timo e baço (WESSLER & KIRKPATRICK, 2001), com elevados níveis em linfócitos T e monócitos (NEUMANN et al., 2007).

AChE (EC 3.1.1.7) é uma enzima que degrada ACh, produzindo colina e um grupo de acetona, sendo expressa pelos linfócitos e considerada um marcador de inflamação (TAYEBATI et al., 2002). Linfócitos expressam diversos receptores de neurotransmissores, incluindo adrenérgicos, dopaminérgicos e colinérgicos (TAYEBATI et al., 2002), dentre os colinérgicos, destacam-se os receptores muscarínicos de ACh (mAChRs) e nicotínicos (nAChRs) (KAWASHIMA & FUJII, 2004).

ACh e seus agonistas mAChR e nAChR aumentam a citotoxicidade dos linfócitos, elevando seu conteúdo de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), modulando a síntese de DNA e a proliferação celular, o que dá suporte à tese de que o sistema colinérgico linfocítico participa da regulação da função imune através de receptores de ACh (AChRs) acoplados à fosfolipase-C (PLC) (KAWASHIMA & FUJII, 2003).

Portanto, é provável que o sistema colinérgico presente nas células imunes participe da regulação da resposta imune, através da ativação de mAChRs e nAChRs, estimulando e inibindo as respostas imune e inflamatória, respectivamente. Entretanto, a relação entre nAChRs e mAChRs na regulação das funções de linfócitos T não está completamente elucidada (RAZANI-BOROUJERDI et al., 2008).

2.6 Estresse Oxidativo

Micotoxinas são metabólitos fúngicos conhecidos por serem nocivos à saúde do homem e dos animais. Atualmente, há muitos relatos de enfermidades causadas por micotoxinas associadas aos sistemas digestório, urinário, reprodutivo e imune; e o estresse oxidativo, através da peroxidação lipídica, é importante na mediação da toxicidade induzida pelas micotoxinas nesses sistemas (DOI & UETSUKA, 2014).

Uma variedade de espécies reativas de oxigênio (EROs) é permanentemente produzida em organismos vivos, através da redução de oxigênio e radiações ionizantes, metais reativos, enzimas e outros ativadores endógenos e ambientais (MONAHAN et al., 1993). O estresse oxidativo resulta de um desequilíbrio entre a produção de EROs e atividade de antioxidantes (VOSSSEN et al., 2011). O equilíbrio entre pró-oxidantes (EROs) e antioxidantes é crucial para a homeostasia intracelular. O excesso de EROs é prejudicial, entretanto, as células possuem um organizado sistema de defesa composto por moléculas antioxidantes, tais como, grupos sulfidrilo, vitamina C e enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathiona peroxidase (GPx), os quais agem de modo sinérgico contra os efeitos oxidativos (WANG et al., 2009)

A geração de EROs está envolvida em funções fisiológicas importantes de organismos aeróbios. No entanto, seu excesso, pode causar desequilíbrio nas rotas metabólicas; esgotamento de antioxidantes celulares e danos de macromoléculas como DNA, proteínas e lípidos, ocasionando lesões oxidativas que resultam em diminuição dos processos de diferenciação e proliferação ou morte celular. EROs atuam como mensageiros subcelulares em múltiplas vias de sinalização e podem estar relacionados com a causa, ou mesmo,

consequência de alterações mitocondriais, assim como, de morte celular por apoptose, desempenhando função essencial em eventos moleculares que levam a danos celulares, principalmente pela indução da peroxidação lipídica (FERRER et al., 2009).

A peroxidação lipídica é uma etapa importante no processo de dano oxidativo tecidual (OMAR et al., 1990), e está relacionada à degeneração das funções fisiológicas, bem como, o aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas através do comprometimento do sistema imune, e à redução da viabilidade celular induzida por micotoxinas (FERRER et al., 2009). Um composto frequentemente utilizado como um índice de peroxidação lipídica é o MDA, produto de oxidação secundário formado durante a oxidação de PUFA (ácidos graxos poli-insaturados) (Figura 5). Peróxidos lipídicos e os seus produtos podem causar danos oxidativos a enzimas ligadas a membranas e outras macromoléculas, incluindo DNA, e têm sido implicadas em vários processos de doença (VOSSEN et al., 2011). Lipídios poli-insaturados são essenciais para as células, como constituintes das membranas celulares, retículo endoplasmático e mitocôndrias e, portanto, estruturas funcionais celulares (MARIN & TARANU, 2012).

EROs podem causar danos irreversíveis às células e a mensuração de seus produtos oxidativos se faz necessária, conseqüentemente, o estabelecimento da relação entre a diminuição da proliferação celular e o estresse oxidativo causado pelo aumento da produção de EROs intracelular induzido pelas micotoxinas é fundamental. O ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o método mais comum de avaliação dos produtos da peroxidação lipídica. TBARS determina os produtos finais aldeídicos, como o MDA, produto final de uma variedade de peróxidos lipídicos e produtos secundários da oxidação de lipídica (FERRER et al., 2009).

MDA reage com o ácido tiobarbitúrico, produzindo um produto de coloração vermelha. Sua avaliação direta e a mensuração de radicais livres é dificultada pelas meias-vidas curtas e a curta distância de migração. Os métodos indiretos, como a quantificação dos produtos resultantes da decomposição peroxidativa de PUFA, como 4-hidroxinonal (4-HNE) e MDA são utilizados como estimativa de danos causados por EROs (SIDDIQUE et al., 2012).

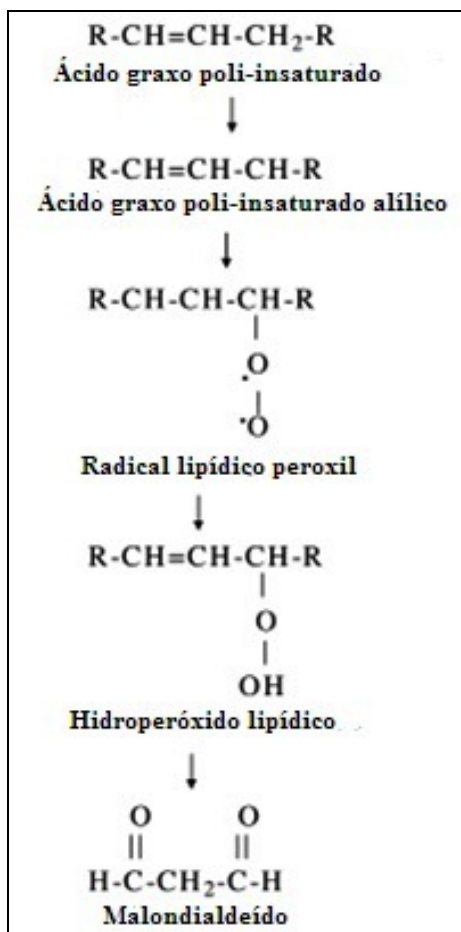


FIGURA 5- Etapas da peroxidação lipídica.
 FONTE: ALESSIO, 2000.

Não está bem elucidado se as micotoxinas estimulam a peroxidação lipídica diretamente através do aumento da síntese de EROs, ou se o aumento da suscetibilidade tecidual à peroxidação é o resultado do comprometimento do sistema defesa antioxidante, mas parece que ambos os processos estão envolvidos (MARIN & TARANU, 2012).

3. ARTIGO CIENTÍFICO

3.1. Manuscrito 1

EFEITOS *IN VITRO* DE OCRATOXINA A, DEOXINIVALENOL E ZEARALENONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E ATIVIDADE DE E-ADA EM LINFÓCITOS DE FRANGOS DE CORTE

Artigo publicado na revista *Pesquisa Veterinária Brasileira*

Efeitos *in vitro* de ocratoxina A, deoxinivalenol e zearalenona sobre a viabilidade celular e atividade de E-ADA em linfócitos de frangos de corte¹

Claudia Lautert², Laerte Ferreiro², Carine E.P. Zimmermann³, Livia G. Castilhos⁴, Francielli P.K. de Jesus², Régis A. Zanette³, Daniela B.R. Leal⁴ e Janio M. Santurio^{3*}

ABSTRACT- Lautert C., Ferreiro L., Zimmermann C.E.P., Castilhos L.G., Jesus F.P.K., Zanette R.A., Leal D.B.R. & Santurio J.M. 2014. [*In vitro* effects of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone on cell viability and E-ADA activity in broiler chickens lymphocytes.] Efeitos *in vitro* de ocratoxina A, deoxinivalenol e zearalenona sobre a viabilidade celular e atividade de E-ADA em linfócitos de frangos de corte. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 34(12):1173-1180. Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: claudialautert@yahoo.com.br

Mycotoxins are a group of chemically diverse naturally occurring substances resulting from the secondary metabolism of pathogenic filamentous fungi. They are produced mainly by the genera *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* and *Penicillium* which can contaminate grains and cereals such as wheat, corn and soy. According to the nature and the concentration levels, mycotoxins can induce toxic effects in food-production animals and humans. An *in vitro* study was conducted to evaluate the susceptibility of broiler chickens lymphocytes to different concentrations of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone. Each toxin was added to the cell medium at different concentrations (0.001, 0.01, 0.1 and 1 µg/mL). Cell viability and ecto-adenosine deaminase activity were assessed at 24, 48 and 72 hours by colorimetric assays. Thus, it were used 0.7×10^5 lymphocytes/mL in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 2.5 IU of penicillin/streptomycin per mL, incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. All the experiments were carried out in triplicate and the results were expressed as mean ± standard error of the mean. The results showed that OTA and DON induced lymphocyte proliferation and reduced enzymatic activity *in vitro* (P<0,05), whereas ZEA also promoted proliferation (P<0,05), but neither alteration on enzymatic activity (P>0,05). It was possible to correlate the results about viability cell and ecto-adenosine deaminase activity, suggesting that, at minimal concentrations, the evaluated mycotoxins do not stimulated the enzymatic activity, which has proinflammatory action and contributes for the immunosuppression process, thus, avoiding a decrease on the viability cell. This is the first *in vitro* study conducted with OTA, DON and ZON in broiler chickens lymphocytes evaluating these parameters.

INDEX TERMS: Mycotoxins, leukocytes, cytotoxicity, poultry, colorimetric assays.

¹ Recebido em 13 de março de 2014.

Aceito para publicação em 10 de outubro de 2014.

² Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 95320-000, Brasil. E-mail: laerte.ferreiro@ufrgs.br

³ Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: janio.santurio@gmail.com

⁴ Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMIP), Departamento de Microbiologia e Parasitologia, UFSM, Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS. E-mail: dbitencourtrosaleal@gmail.com

RESUMO.- Micotoxinas representam um vasto grupo de contaminantes químicos naturais originados a partir do metabolismo secundário de fungos filamentosos patogênicos. Elas são produzidas, principalmente, pelos gêneros *Fusarium*, *Alternaria*, *Aspergillus* e *Penicillium*, os quais podem contaminar grãos e cereais, como trigo, milho e soja. Conforme sua natureza e níveis de concentração, micotoxinas podem induzir efeitos tóxicos em animais de produção e humanos. Um estudo *in vitro* foi realizado para avaliar a susceptibilidade das células linfocitárias de frangos de corte a diferentes concentrações de ocratoxina A, deoxini-

valenol e zearalenona. Cada micotoxina foi adicionada ao meio celular em diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL). A viabilidade celular e atividade de ecto-adenosina desaminase foram analisadas em 24, 48 e 72 horas através de ensaios colorimétricos. Para isso, foram utilizados $0,7 \times 10^5$ linfócitos/mL em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2,5 UI de penicilina/estreptomicina por mL, incubados em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e erro padrão da média. Os resultados obtidos demonstraram que tanto ocratoxina A como deoxinivalenol induziram proliferação linfocitária e baixa atividade enzimática *in vitro* ($P < 0,05$), enquanto zearalenona também induziu proliferação ($P < 0,05$), mas nenhuma alteração na atividade enzimática ($P > 0,05$). Foi possível correlacionar os dados referentes à viabilidade celular e atividade de ecto-adenosina desaminase, sugerindo que, em concentrações mínimas, as micotoxinas testadas não estimularam a atividade da enzima, que possui ação pró-inflamatória e contribui para o processo de imunossupressão e, portanto, evitando um decréscimo na viabilidade celular. Este é o primeiro estudo feito com OCRA, DON e ZEA sobre linfócitos de frangos de corte em cultivos *in vitro* na avaliação desses parâmetros.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Micotoxinas, leucócitos, citotoxicidade, aves domésticas, ensaios colorimétricos.

INTRODUÇÃO

Há muitos séculos se conhece a toxicidade de certos fungos. Entretanto, somente em 1.850, ao relacionar a ingestão de centeio infectado pelo fungo *Claviceps purpurea* com as características clínicas do ergotismo, foi levantada a possibilidade de haver risco à saúde humana e animal pela ingestão de metabólitos secundários produzidos por fungos (Sanurio 2000). Micotoxinas são metabólitos fúngicos secundários contaminantes de uma série de grãos e frutas pré ou pós-colheita. Aflatoxinas, deoxinivalenol, ocratoxina A, fumonisinas, zearalenona, patulina e toxina T-2 são as mais importantes micotoxinas, as quais são caracteristicamente estáveis em condições ambientais e causadoras de diversos efeitos tóxicos em animais de laboratório, de produção e em humanos (Chen et al. 2008).

Ocratoxina A (OCRA) é uma micotoxina de ocorrência natural produzida por fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em uma variedade de regiões geográficas e climáticas. Por ser um contaminante natural de alimentos estocados, e consequentemente, destinados à produção de animais como frangos, são relatados muitos surtos de ocratoxicose (Wang et al. 2009). As toxinas provenientes do gênero *Fusarium*, deoxinivalenol (DON) e zearalenona (ZEA), são as principais em humanos e na nutrição animal devido sua frequência e ocorrência concomitante em concentrações toxicologicamente relevantes em grãos de cereais no mundo inteiro (Goyarts et al. 2007).

Sistemas *in vitro* permitem tanto uma dosagem mais exata de toxinas, quanto uma duração de exposição definida em um meio quimicamente e fisicamente uniforme, se comparados a técnicas *in vivo*. Além disso, ensaios *in vitro*

podem proporcionar resultados e conclusões significativos, reconhecidos e reproduzíveis. Várias linhagens celulares já foram utilizadas em estudos de culturas de tecidos para testes de citotoxicidade de diversas micotoxinas. Efeitos citotóxicos de células em cultura podem ser avaliados através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). MTT é um reagente salino de coloração amarela que é reduzido a cristais púrpuros escuros de formazan pela ação de enzimas mitocondriais em células viáveis, sendo frequentemente utilizado em estudos de citotoxicidade de micotoxinas, para avaliação da viabilidade e proliferação celular (Lewis et al. 1999).

Alterações na integridade da membrana plasmática podem ser determinadas pela mensuração de enzimas liberadas no meio de cultura pelas células danificadas (Widstrand et al. 1999). Ecto-adenosina desaminase (E-ADA) é considerada uma enzima chave no metabolismo de purinas, catalisando a irreversível desaminação da adenosina e desoxiadenosina em inosina e desoxiinosina, respectivamente, e regulando as concentrações de adenosina (Ado) extracelular (Franco et al. 1997). E-ADA está presente em todos os tipos celulares, com alta atividade no timo, tecidos linfóides e linfócitos periféricos, desempenhando função essencial para o crescimento normal, diferenciação e proliferação de linfócitos T (Franco et al. 1997, Codero et al. 2001).

O escopo do presente trabalho de pesquisa visou avaliar os possíveis efeitos das micotoxinas OCRA, DON e ZEA, relacionados à viabilidade celular e atividade enzimática de E-ADA, em linfócitos de frangos de corte cultivados *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

Micotoxinas. As micotoxinas utilizadas foram ocratoxina A (OCRA), deoxynivalenol (DON) e zearalenona (ZEA) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Elas foram solubilizadas em etanol (5%), diluídas nas concentrações 0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL e adicionadas em cultivos celulares de linfócitos para respectiva avaliação.

Células e cultura. O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI-UFSM). Os linfócitos foram isolados do sangue de frangos de corte, respeitando a conduta do bem estar animal conforme Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA-UFSM). O pool sanguíneo foi coletado, de 30 aves comerciais da linhagem COBB 500 com 45 dias, através de tubos cônicos falcon com EDTA 10%, e a técnica de separação celular utilizada, através de centrifugação por gradiente de densidade, conforme a descrita por Böyum (1968). Após contagem em câmara de Neubauer com adição do corante Azul de Trypan (0,1%), foram utilizados $0,7 \times 10^5$ linfócitos/mL em meio RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2,5 UI de penicilina/estreptomicina (Sigma), em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. A suspensão de células foi colocada em placa de 96 micropoços e mantida em crescimento exponencial, em uma confluência de 80%. Cada micotoxina foi adicionada (20 µL) ao meio celular em diferentes concentrações (0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL), exceto no grupo controle (0), contendo apenas meio de cultura e células. A viabilidade celular e a atividade enzimática de E-ADA foram analisadas em 24, 48 e 72 horas.

Ensaio de viabilidade celular. A viabilidade celular dos linfócitos de frangos de corte foi avaliada pelo ensaio de MTT (Vy-

brant® MTT Cell Proliferation Assay Kit-Invitrogen). A reação é catalisada pela succinil desidrogenase mitocondrial e exige NADH, que deve ser fornecida pelas células, proporcionando então uma indicação de competência mitocondrial ou respiratória. Cada poço, contendo os diferentes grupos representados pelas diferentes concentrações e micotoxinas testadas, foi inoculado com 10 µL de MTT (5mg/mL), e as células foram incubadas durante 4 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após, o meio foi cuidadosamente removido e o produto corado foi dissolvido com 50µL de DMSO (dimetilsulfóxido), realizando novamente incubação pelo período de 10 min sob as mesmas condições referidas acima. A leitura foi feita através de espectrofotometria (Bio-Rad model 3550 Microplate reader), utilizando um comprimento de onda de 595 nm. Poços controles foram utilizados para verificar se houve ou não proliferação celular, e se a viabilidade foi influenciada pelas concentrações mínimas das respectivas micotoxinas. Os resultados foram expressos em porcentagem.

Determinação da atividade de E-ADA. E-ADA, em amostras de linfócitos, foi determinada espectrofotometricamente de acordo com o método colorimétrico de Giusti & Galanti (1984), no qual 25µL de linfócitos reagem com adenosina (21mmol/L), pH 6,5, em um período de incubação de 60 minutos a 37°C. Este método é baseado na produção direta de amônia quando a adenosina desaminase tem sua ação na adenosina. O comprimento de onda utilizado para a leitura foi 620 nm. Os resultados foram expressos em U/mg, na qual uma unidade (1U) de ADA é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 mmol de amônia por minuto a partir da adenosina em condições padrão de ensaio.

Determinação protéica. A determinação de proteína foi realizada pelo método Azul de Comassie, usando albumina bovina como padrão, conforme descrito por Bradford (1976).

Análise estatística. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico ANOVA de uma via seguido pelo *post test* Newman-Keuls, utilizando nível de significância de $P < 0,05$. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média e erro padrão da média.

RESULTADOS

Na avaliação da viabilidade celular, dos linfócitos de frangos de corte incubados com a micotoxina OCRA, observou-se proliferação celular ($111,20 \pm 4,90$) no período de 48 h relacionada à menor concentração utilizada, 0,001 µg/mL, em relação a $97,66 \pm 1,33$ do grupo controle; enquanto que em 72 h de incubação, apenas a concentração de 0,1µg/mL não influenciou resultado significativo, já que as demais concentrações: 0,001; 0,01 e 1µg/mL, também causaram comportamento proliferativo caracterizado pelos seguintes valores (média ± erro padrão da média), respectivamente, $95,05 \pm 1,30$; $100,25 \pm 1,11$ e $97,46 \pm 1,67$, quando comparadas ao grupo controle ($88 \pm 0,57$) ($P < 0,05$) (Fig.1).

A micotoxina DON, na concentração de 0,01µg/mL, no período de 48 h, induziu proliferação celular ($114,75 \pm 5,75$) quando comparada ao grupo controle ($97,66 \pm 1,33$) (Fig.2) ($P < 0,05$).

Quanto ao comportamento celular observado após a incubação com ZEA, evidenciou-se proliferação linfocitária nas amostras incubadas com as respectivas concentrações da micotoxina: 0,001 ($107,84 \pm 1,84$); 0,01 ($105,97 \pm 2,02$) e 0,1µg/mL ($105,97 \pm 1,12$), somente no período de 48 h, enquanto o grupo controle (o) apresentou $96,33 \pm 1,33$ de viabilidade celular ($P < 0,05$) (Fig.3).

Em relação à avaliação da atividade enzimática, as cé-

lulas linfocitárias incubadas com OCRA apresentaram decréscimo da atividade de E-ADA quando comparadas ao grupo controle em todos os períodos analisados ($P < 0,05$), com exceção dos linfócitos incubados com as concentrações 0,001 e 1µg/mL em 24 h de incubação (Fig.4). DON, na concentração de 0,01µg/mL, induziu diminuição da atividade de E-ADA em todos os tempos analisados em relação ao grupo controle ($P < 0,05$) (Fig.5). Os valores da atividade de E-ADA pós-incubação com OCRA e DON estão representados nos Quadros 1 e 2, respectivamente. Os linfócitos incubados com a micotoxina ZEA não apresentaram resultados significativos ($P > 0,05$) (Fig.6).

DISCUSSÃO

O sistema de sinalização purinérgico desempenha importante função moduladora das respostas imune e inflamatória através de moléculas extracelulares, tais como, nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e seus derivados nucleosídeos de Ado (Ralevic & Burnstock 2003). Evidências indicam que altos níveis de ATP extracelular agem através de receptores específicos da superfície celular como agentes pró-inflamatórios, potencializando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (Bours et al. 2006) a partir de linfócitos ativados (Langston et al. 2003). Entretanto, baixos níveis de ATP extracelular atuam como moduladores negativos da imunidade (Di Virgilio & Boeynaems & Robson 2009). A quebra de seu produto, Ado, exibe potente ação imunossupressiva e inflamatória pela inibição da proliferação de células T e secreção de citocinas (Deaglio et al. 2007, Gessi et al. 2007). Ado também age como regulador endógeno da imunidade inata, protegendo o hospedeiro de tecidos excessivamente danificados associados com inflamação intensa (Desrosiers et al. 2007). Em nosso estudo, não foi realizada a quantificação de Ado, mas sim da atividade de sua enzima extracelular E-ADA.

Uma redução na atividade de E-ADA em linfócitos levaria à interação de Ado com receptores de adenosina (AdoRs) que existem em muitos tipos celulares com possíveis efeitos anti-inflamatórios. Esta redução causaria um aumento nas concentrações extracelulares de Ado, que seria convertida em inosina. Ado atua como um sensor e fornece informação ao sistema imune através de tecidos danificados ou alterações inflamatórias agudas (Kumar & Sharma 2009). Então, o decréscimo de E-ADA em linfócitos poderia estar relacionado a um mecanismo compensatório, o que levaria a uma elevação das concentrações extracelulares de Ado, a qual agiria sobre receptores purinérgicos, atenuando inflamação e dano tecidual, o que poderia explicar a correlação entre o aumento da viabilidade celular e a baixa atividade enzimática encontrados nos resultados associados com OCRA e DON.

Não há estudos a respeito de E-ADA em culturas de frangos de corte, mas podemos encontrar estudos semelhantes em culturas de células humanas. Iwaki-Egawa & Watanabe (2002) demonstraram que há propriedades similares em relação às propriedades de E-ADA sobre especificidades de substrato, sensibilidades a inibidores e perfil do pH entre a enzima proveniente de humanos e naquela oriunda de frangos. É importante ressaltar essa informação, pois uma

comparação entre os dados obtidos a partir de pesquisas em culturas de células humanas e os obtidos pelo presente experimento não é inválida.

O potencial imunotóxico de OCRA tem sido estudado em diferentes modelos experimentais, consequentemente, os dados disponíveis são geralmente contraditórios e

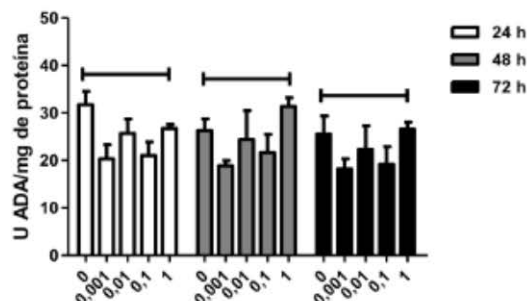
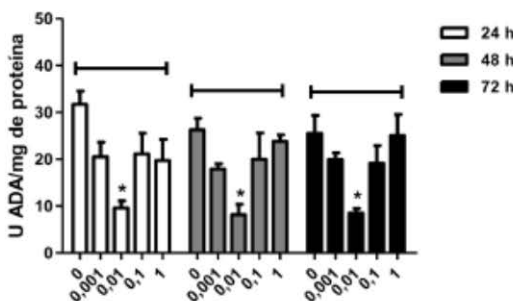
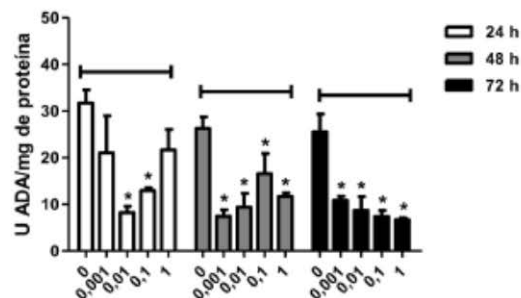
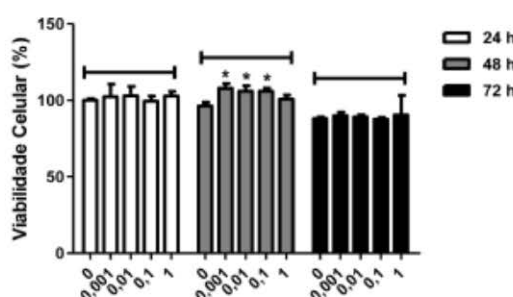
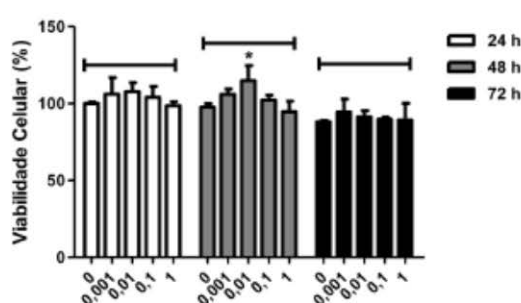
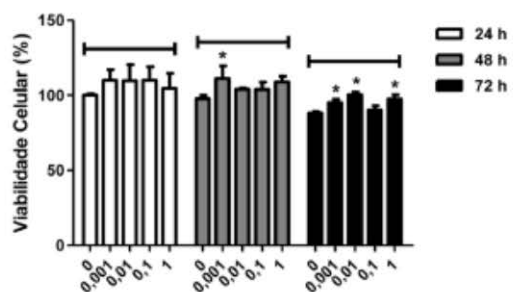


Fig.1. Viabilidade celular dos linfócitos incubados com a micotoxina OCRA nas concentrações 0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL em 24, 48 e 72 h de exposição. *Diferença significativa ($P < 0,05$).

Fig.3. Viabilidade celular dos linfócitos incubados com a micotoxina ZEA nas concentrações 0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL em 24, 48 e 72 h de exposição. *Diferença significativa ($P < 0,05$).

Fig.5. Atividade enzimática de E-ADA dos linfócitos incubados com a micotoxina DON nas concentrações 0; 0,001; 0,1 e 1 µg/mL em 24, 48 e 72 h de exposição. *Diferença significativa ($P < 0,05$).

Fig.2. Viabilidade celular dos linfócitos incubados com a micotoxina DON nas concentrações 0; 0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg/mL em 24, 48 e 72 h de exposição. *Diferença significativa ($P < 0,05$).

Fig.4. Atividade enzimática de E-ADA dos linfócitos incubados com a micotoxina OCRA nas concentrações 0; 0,001; 0,1 e 1 µg/mL em 24, 48 e 72 h de exposição. *Diferença significativa ($P < 0,05$).

Fig.6. Atividade enzimática de E-ADA dos linfócitos incubados com a micotoxina ZEA nas concentrações 0; 0,001; 0,1 e 1 µg/mL em 24, 48 e 72 h de exposição.

Quadro 1. Atividade de E-ADA (U/mg de proteína) em linfócitos de frangos de corte incubados com as respectivas concentrações da micotoxina OCRA em 24, 48 e 72 h (M \pm SEM)

Concentração (μ g/mL)	Período de incubação		
	24 h	48 h	72 h
0	31,71 \pm 2,84	26,25 \pm 2,50	25,52 \pm 3,84
0,001	21,05 \pm 7,91	7,45 \pm 1,34	10,86 \pm 0,85
0,01	8,19 \pm 1,41	9,41 \pm 2,93	8,70 \pm 2,94
0,1	12,95 \pm 0,60	16,56 \pm 4,32	7,34 \pm 1,34
1	21,66 \pm 4,41	11,68 \pm 0,80	6,74 \pm 0,30

^a Grupo controle; * (P<0,05).

Quadro 2. Atividade de E-ADA (U/mg de proteína) em linfócitos de frangos de corte incubados com as respectivas concentrações da micotoxina DON em 24, 48 e 72 h (M \pm SEM)

Concentração (μ g/mL)	Período de incubação		
	24 h	48 h	72 h
0	31,71 \pm 2,84	26,25 \pm 2,50	25,52 \pm 3,84
0,001	20,53 \pm 3,12	17,89 \pm 1,11	19,99 \pm 1,34
0,01	9,61 \pm 1,49	8,15 \pm 2,26	8,48 \pm 1,02
0,1	21,14 \pm 4,41	20,02 \pm 5,57	19,15 \pm 3,77
1	19,71 \pm 4,50	23,81 \pm 1,39	25,05 \pm 4,51

^a Grupo controle; * (P<0,05).

difíceis de interpretar. Essas diferentes conclusões podem ser devido às concentrações testadas da micotoxina, características particulares das linhagens celulares, diferentes condições de cultura, ao período de exposição e critérios utilizados no estudo (Alvarez-Ervil et al. 2005). Estudos demonstram que OCRA suprime a resposta de anticorpos em inúmeras espécies (Haubeck et al. 1981, Harvey et al. 1992, Stormer & Lea 1995, Müller et al. 1999). Em relação à imunidade humoral, OCRA induz uma regressão dose-dependente das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM (Müller et al. 1995, Dortant et al. 2001). Em relação à imunidade mediada por células, a resposta proliferativa de células B não foi alterada pela micotoxina em ratos (Dortant et al. 2001) ou camundongos (Thuvander & Breitholtz-Emanuelsson & Olsen 1995). A resposta proliferativa de linfócitos T apresentou decréscimo em suínos (Harvey et al. 1992) e frangos de corte (Elissalde et al. 1994). A atividade de linfócitos T citotóxicos não foi afetada em camundongos (Luster et al. 1987). Entretanto, apesar da associação de OCRA com eventos de imunossupressão, nosso estudo demonstrou que em concentrações mínimas, esta micotoxina pode induzir proliferação celular, já que a viabilidade dos linfócitos incubados com 0,001, 0,01 e 1 μ g/mL, em 72 h de exposição, apresentou um aumento em relação ao grupo controle.

Embora na literatura existam muitos modelos experimentais para o estudo de OCRA, poucos experimentos são desenvolvidos a partir de protocolos *in vitro* utilizando o isolamento de células imunes. E mais escassos ainda, são tais protocolos a partir de células imunes de frangos de corte, o que dificulta a comparação dos dados obtidos em nosso estudo. Estudos realizados com linfócitos humanos demonstraram que o tratamento com OCRA inibiu a resposta proliferativa da população de células T e a produção

de IL-2 (Lea et al. 1989). OCRA também apresentou consistente efeito sobre a síntese protéica e inibição da síntese de DNA em células T (Stormer et al. 1983). Tais resultados confirmam a hipótese proposta por Creppy et al. (1983) na qual OCRA inibe a síntese protéica devido sua interação com a fenilalanina-tRNA sintetase. Mais recentemente, foi demonstrado que OCRA induz apoptose de modo dose e tempo-dependente em células T humanas através da desestabilização da função mitocondrial (Assaf et al. 2004). O ensaio de MTT, utilizado pelo presente estudo, para a avaliação da viabilidade linfocitária a partir da função mitocondrial, não permitiu concluir o mesmo que Assaf et al. (2004), pois em determinadas concentrações mínimas da micotoxina houve uma indução de elevação de viabilidade celular, em 48 e 72 h, mas esta não procedeu de modo dose-dependente.

Macrófagos e células T e B do sistema imune são alvos centrais de DON, que pode ser tanto imunestimulatório quanto imunossupressivo, conforme a dose, exposição e tempo do ensaio imune funcional (Tiemann & Dänicke 2007). Considera-se que o modo de ação primário de DON seja a habilidade de se ligar a ribossomos eucarióticos e, por consequência a isso, a inibição da síntese proteica. Mecanismos secundários, tais como bloqueio da sinalização celular, diferenciação, crescimento e síntese macromolecular também têm sido associados com exposição a DON (Costa et al. 2011). Estudos em modelos animais e linhagens celulares têm demonstrado que a exposição à DON modula a função imune por influenciar especificamente as respostas pró-inflamatórias, a distribuição das células brancas e sua proliferação em diversos órgãos (Costa et al. 2011). No estudo *in vivo* de Pestka (2003), baixas concentrações de DON (inferiores a 5mg/kg de ração) pareceram estimular a imunidade e altas concentrações suprimiram a resposta imune em roedores. Em nosso estudo, a concentração 0,01 μ g/mL foi responsável pelo aumento dos níveis de viabilidade celular em 48 h pós-incubação quando comparado ao grupo controle, demonstrando que DON, em concentrações mínimas, pode promover proliferação celular em avaliações *in vitro* a partir de culturas celulares. Infelizmente, limitadas informações são disponíveis a respeito da imunotoxicidade de DON em frangos de corte (Wageha et al. 2013), dificultando maiores discussões em relação aos dados encontrados.

Quanto à avaliação de E-ADA, DON na concentração de 0,01 μ g/mL induziu uma reduzida atividade enzimática em todos os períodos analisados ao compararmos com o grupo controle. Estudos como o de Bach et al. (2013), Souza et al. (2012) e Tonin et al. (2012) foram utilizados para uma comparação dos resultados relacionados à atividade de E-ADA, mas a metodologia empregada nessas pesquisas foram baseadas em pesquisas *in vivo*, ou seja, não houve estimulação antigênica diretamente nas células cultivadas *in vitro*. Portanto, pode-se discutir somente o fato de que a atividade enzimática de E-ADA diminuiu os níveis de Ado disponíveis para estimular AdoRs expressos na superfície celular e este mecanismo contribui para a regulação do sistema imune (Hashikawa et al. 2004), sugerindo que tal mecanismo pode ter ocorrido após a incubação com

determinadas concentrações mínimas de OCRA e DON, já que E-ADA poderia contribuir para limitar o processo de inflamação e subsequentes danos celulares (Abbraccio & Ceruti 2007).

Pesquisas comprovam que a reduzida atividade de E-ADA também pode estar associada ao processo de hipóxia em cultivos celulares *in vitro* (Ramakers et al. 2012, By et al. 2012). Apesar dessa afirmação, e sabermos que há um processo natural de decréscimo celular em cultivos *in vitro*, aliado ao fato de células do sistema imunológico, como os linfócitos, apresentarem sensibilidade exacerbada e manterem-se pouco tempo em cultura; ao compararmos as amostras incubadas com as diferentes concentrações das três micotoxinas testadas no presente estudo com seus grupos controles de cada período analisado, constatamos que a viabilidade celular manteve-se em níveis elevados.

Comparativamente, o estudo de Maenetje et al. (2008), cujo objetivo principal foi avaliar a citotoxicidade de AFB₁, DON e OCRA sobre linfócitos isolados de humanos, utilizando também o ensaio de MTT para posterior análise da viabilidade celular; constatou que OCRA foi mais citotóxica que as outras duas micotoxinas após 24 horas de incubação. Várias hipóteses, a respeito do mecanismo de interação de OCRA e seus metabólitos com moléculas endógenas, têm sido levantadas para explicar sua toxicidade. Elas estão relacionadas a interações específicas, baseadas em ligações altamente específicas em moléculas alvos e, interações não específicas, baseadas na reatividade química de OCRA e seus metabólitos à molécula alvo (Ringot et al. 2006). Os resultados encontrados por Maenetje et al. (2008) divergem dos apresentados nesse estudo, já que as micotoxinas DON e OCRA promoveram proliferação celular; destacando-se OCRA, que ocasionou tal comportamento na maioria (exceto no grupo incubado com 0,1µg/mL da micotoxina) das culturas linfocitárias incubadas com suas concentrações mínimas no período de 72 h de exposição, demonstrando que não houve alteração da integridade da membrana celular já que a atividade de E-ADA associada apresentou decréscimo em seus níveis.

Os dados referentes às micotoxinas OCRA e DON demonstraram que as mesmas não foram citotóxicas nas concentrações testadas, permitindo uma adequada comparação entre os parâmetros avaliados. Mas em se tratando de ZEA, que também não demonstrou citotoxicidade, esta comparação não pode ser realizada já que a mesma não induziu alteração na atividade de E-ADA. Basicamente, há dois processos de biotransformação de ZEA: primeiro, ZEA é reduzida à α -zearalenol e β -zearalenol, reação catalisada por 3 α -HSD e 3 β -HSD (enzimas hidroxisteróide desidrogenases); segundo, ZEA e seus metabólitos reduzidos são conjugados com ácido glicurônico, transformação catalisada pela UDPGT (uridina difosfato glicuroniltransferase). Determinadas espécies animais têm susceptibilidades diferenciadas à ZEA devido seus processos de biotransformação. Conforme dados de estudos, a biotransformação hepática desta micotoxina em α -zearalenol pode ser considerada como uma reação de bioativação e a sua transformação em β -zearalenol como uma reação de detoxificação. Em frangos, β -zearalenol é o principal produto em ambos os isola-

dos de frações microsossomal e pós-mitocondrial, dado consistente com estudos anteriores em hepatócitos de frangos de corte (Gajecki et al. 2010). Sendo assim, como não há biotransformação da micotoxina em α -zearalenol pelo metabolismo hepático de frangos, consequentemente não há susceptibilidade desta espécie a contaminações por ZEA *in vivo*. Entretanto, *in vitro*, o presente estudo evidenciou aumento na viabilidade celular correspondente ao período de 48 h pós-incubação (exceto nas células tratadas com 1 µg/ml da micotoxina). Este é o primeiro trabalho a demonstrar proliferação celular induzida por ZEA em linfócitos de frangos de corte. Assim como nas demais micotoxinas avaliadas em nosso estudo, ZEA também está associada a eventos de imunossupressão. Como no estudo de Vlata et al. (2006), que investigou os efeitos citopáticos *in vitro* de ZEA, sobre células mononucleares do sangue periférico (PBMC) isoladas de humanos em relação aos padrões de proliferação e morte celular de células não tratadas e mitógeno-ativadas, constatando que em concentrações superiores a 30µg/mL, ZEA inibiu totalmente a proliferação de linfócitos T e B, e seus efeitos inibitórios foram relacionados à necrose e apoptose celular.

É importante destacar que este é o primeiro estudo realizado com OCRA, DON e ZEA, em linfócitos de frangos de corte cultivados *in vitro*, a avaliar sua citotoxicidade a partir dos parâmetros de viabilidade celular e atividade de E-ADA.

CONCLUSÕES

Os ensaios colorimétricos utilizados para avaliação de viabilidade celular e atividade enzimática permitiram adequada comparabilidade dos resultados entre as diferentes micotoxinas.

Foi possível correlacionar a proliferação celular ocasionada por determinadas concentrações de OCRA e DON com um decréscimo da atividade de E-ADA em linfócitos de frangos de corte incubados com as respectivas micotoxinas.

Tais evidências sugerem que em concentrações mínimas as micotoxinas testadas não estimularam a atividade da enzima, que possui ação pró-inflamatória e contribui para o processo de imunossupressão e, portanto, evitando um decréscimo na viabilidade celular.

Para afirmar que as concentrações mínimas testadas, além de induzirem proliferação, induzem imunostímulo são necessários maiores estudos, bem como o uso de técnicas com maior especificidade como a quantificação de citocinas envolvidas na imunomodulação.

Este é o primeiro trabalho a demonstrar proliferação celular induzida por ZEA em linfócitos de frangos de corte.

REFERÊNCIAS

- Abbraccio M.P. & Ceruti S. 2007. P1 receptors and cytokine secretion. *Purinergic Signal*. 3:315-325.
- Alvarez-Ervital L., Leache C., Gonzalez-Pefias E. & Lopez C.A. 2005. Alterations induced *in vitro* by ochratoxin A in rat lymphoid cells. *Hum. Exp. Toxicol.* 24:459-466.
- Assaf H., Azouri H. & Pallardy M. 2004. Ochratoxin A induces apoptosis in human lymphocytes through down regulation of BCL-XL. *Toxicol. Sci.* 79:335-344.

- Bach B.C., Leal D.B.R., Jaques J.A.S., Souza V.C.G., Ruchel J.B., Schlemmer K.B., Zanette R.A., Hecktheuer P.A., Pereira P.L., Casali E.A., Alves S.H. & Santurio J.M. 2013. E-ADA activity in lymphocytes of an experimental model of pythiosis treated with immunotherapy. *Cell Biochem. Funct.* 31:476-481.
- Bours M.J., Swennen E.L., Di Virgilio F., Cronstein B.N. & Dagnelie P.C. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol. Therapeut.* 112:358-404.
- Bøyum A. 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 97:77-89.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- By Y., Jacquin L., Franceschi F., Durand-Gorde J.M., Condo J., Michelet P., Guieu R. & Ruf J. 2012. Fall in oxygen tension of culture medium stimulates the adenosinergic signalling of a human T cell line. *Purinergic Signal.* 8:661-667.
- Chen F., Ma Y., Xue C., Ma J., Xie Q., Wang G., Bi Y. & Cao Y. 2008. The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. *J. Vet. Sci.* 9(1):39-44.
- Codero O., Salgado F., Fernández-Alonso C., Herrera C., Lluís C., Franco R. & Nogueira M. 2001. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 70:920-930.
- Costa A.N., Keen J.N., Wild C.P. & Findlay J.B.C. 2011. An analysis of the phosphoproteome of immune cell lines exposed to the immunomodulatory mycotoxin deoxynivalenol. *Biochim. Biophys. Acta* 1814:850-857.
- Creppy E.E., Kern D., Steyn P.S., Vlegaar R., Rösenthaller R. & Dirheimer G. 1983. Comparative study of the effect of ochratoxin A analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases and on the growth and protein synthesis of hepatoma cells. *Toxicol. Lett.* 19:217-224.
- Deaglio S., Dwyer K.M., Gao W., Friedman D., Usheva A., Erat A., Chen J.F., Enjyoji K., Linden J., Oukka M., Kuchroo V.K., Strom T.B. & Robson S.C. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD37 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257-1265.
- Desrosiers M.D., Katherine M.C., Fakir M.J., Stephens L.A., Jama F.M., Shamel A., Mehal W.Z., Santamaria P. & Shi Y. 2007. Adenosine deaminase sustains dendritic cell activation in inflammation. *J. Immunol.* 179:1884-1892.
- Di Virgilio F., Boeynaems J.M. & Robson S.C. 2009. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. *Curr. Opin. Pharmacol.* 9:507-513.
- Dortant P.M., Peters-Volleberg G.W.M., Van Loveren H., Marquardt R.R. & Speijers G.J.A. 2001. Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. *Food. Chem. Toxicol.* 39:55-65.
- Elissalde M.H., Ziprin R.L., Huff W.E., Kubena L.F. & Harvey R.B. 1994. Effects of ochratoxin A on *Salmonella*-challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 73:1241-1248.
- Franco R., Casado V., Ciruela F., Saura C., Mallo J., Canela E.I. & Lluís C. 1997. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. *Prog. Neurobiol.* 52:283-294.
- Gajęcki M., Gajęcka M., Jakimiuk E., Zielonka Ł. & Obremski K. 2010. Zearalenone biotransformation, p.137-138. In: Rai M. & Varma A. (Eds), *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Cap.9. Springer, Heidelberg, 405p.
- Gessi S., Varani K., Merighi S., Fogli E., Sacchetto V., Benini A., Leung E., MacLennan S. & Borea P.A. 2007. Adenosine and lymphocyte regulation. *Purinergic Signal.* 3:109-116.
- Giusti G. & Galanti B. 1984. *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, p.315-323.
- Goyarts T., Dänicke S., Brüßow K.P., Valenta H., Ueberschär K.H. & Tiemann U. 2007. On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from sows to their fetuses during days 35-70 of gestation. *Toxicol. Lett.* 171:38-49.
- Harvey R.B., Elissalde M.H., Kubena L.F., Weaver E.A., Corrier D.E. & Clement B.A. 1992. Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts. *Am. J. Vet. Res.* 53:1966-1970.
- Hashikawa T., Hooker S.W., Maj J.G., Knott-Craig C.J., Takedachi M., Murakami S. & Thompson L.F. 2004. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. *FASEB J.* 18:131-133.
- Haubeck H.D., Lorkowski G., Kölsch E. & Röschthaler R. 1981. Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:1040-1042.
- Iwaki-Egawa S. & Watanabe Y. 2002. Characterization and purification of adenosine deaminase 1 from human and chicken liver. *Comp. Biochem. Phys. B.* 133:173-182.
- Kumar V. & Sharma A. 2009. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur. J. Pharmacol.* 616:7-15.
- Langston H.P., Ke Y., Gewirtz A.T., Dombrowski K.E. & Kapp J.A. 2003. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J. Immunol.* 170:2962-2970.
- Lea T., Steien K. & Stormer F.C. 1989. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia* 107:153-159.
- Lewis C.W., Smith J.E., Anderson J.G. & Freshney R.I. 1999. Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines *in vitro* enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay. *Mycopathologia* 148:97-102.
- Luster M.I., Germolec D.R., Burlison G.R., Jameson C.W., Ackermann M.F., Lamm K.R. & Hayes H.T. 1987. Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res.* 47:2259-2263.
- Maenette P.W., Villiers N. & Dutton M.F. 2008. The use of isolated human lymphocytes in mycotoxin cytotoxicity testing. *Int. J. Mol. Sci.* 9:1515-1526.
- Müller G., Kieselstein H., Kohler H., Berndt A. & Rosner H. 1995. Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in the mouse model. *Mycoses* 38:85-91.
- Pestka J.J. 2003. Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicol. Lett.* 140:287-295.
- Ralevic V. & Burnstock G. 2003. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. *Drug News Perspect.* 16:133-140.
- Ramakers B.P., Wever K.E., Kox M., Broek P.H., Mbuyi F., Rongen G., Maseeuw R., Hoeven J.G., Smits P., Riksen N.P. & Pickkers P. 2012. How systemic inflammation modulates adenosine metabolism and adenosine receptor expression in humans *in vivo*. *Crit. Care Med.* 40(9):2609-2616.
- Ringot D., Chango A., Schneider Y.J. & Larondelle Y. 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem. Biol. Interact.* 159:18-46.
- Santurio J.M. 2000. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. *Revta Bras. Ciênc. Avic.* 2(1):1-12.
- Souza V.C.G., Schlemmer K.B., Noal C.B., Jaques J.A.S., Zimmermann C.E.P., Leal C.A.M., Fleck J., Casali E.A., Morsch V.M., Schetinger M.R.C. & Leal D.B.R. 2012. E-NTPDase and E-ADA activities are altered in lymphocytes of patients with indeterminate form of Chagas' disease. *Parasitol. Int.* 61:690-696.
- Stormer F.C. & Lea T. 1995. Effects of ochratoxin A upon early and late events in human T-cell proliferation. *Toxicology* 95:45-50.
- Stormer F.C., Støren O., Hansen C.E., Pedersen J.I. & Aasen A.J. 1983. Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1183-1187.
- Thuvander A., Breitholtz-Emanuelsson A. & Olsen M. 1995. Effects of ochratoxin A on the mouse immune system after subchronic exposure. *Food Chem. Toxicol.* 33:1005-1011.
- Tiemann U. & Dänicke S. 2007. *In vivo* and *in vitro* effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: A review. *Food Addit. Contam. A* 24(3):306-314.
- Tonin A.A., Pimentel V.C., Silva A.S., Azevedo M.I., Souza V.C.G., Wolkmer P.

- Rezer J.F.P., Badke M.R.T., Leal D.B.R., Schetinger M.R.C., Monteiro S.G. & Lopes S.T.A. 2012. Adenosine deaminase activity in serum, erythrocytes and lymphocytes of rats infected with *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *Res. Vet. Sci.* 92:197-201.
- Vlata Z., Porichis F., Tzanakakis G., Tsatsakis A. & Krambovitis E. 2006. A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicol. Lett.* 165:274-281.
- Wageha A., Ghareeb K., Böhm J. & Zentek J. 2013. The toxicological impacts of the *Fusarium* mycotoxin, deoxynivalenol, in poultry flocks with special reference to immunotoxicity. *Toxins* 5:912-925.
- Wang G.H., Xue C.Y., Chen F., Ma Y.L., Zhang X.B., Bi Y.Z. & Cao Y.C. 2009. Effects of combinations of ochratoxin A and T-2 toxin on immune function of yellow-feathered broiler chickens. *Poult. Sci.* 88:504-510.
- Widestrand J., Lundh T., Pettersson H. & Lindberg J.E. 1999. Cytotoxicity of four trichothecenes evaluated by three colorimetric bioassays. *Mycopathologia* 147:149-155.

3.2. Manuscrito 2

INDIVIDUAL *IN VITRO* EFFECTS OF OCHRATOXIN A, DEOXYNIVALENOL AND ZEARALENONE ON OXIDATIVE STRESS AND ACETYLCHOLINESTERASE IN LYMPHOCYTES OF BROILER CHICKENS

Artigo publicado na revista *SpringerPlus Journal*

RESEARCH

Open Access

Individual *in vitro* effects of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and acetylcholinesterase in lymphocytes of broiler chickens

Claudia Lautert¹, Laerte Ferreiro¹, Patrícia Wolkmer², Francine C Paim³, Cássia B da Silva³, Jeandre AS Jaques⁴, Sônia TA Lopes³ and Janio M Santurio^{5*}

Abstract

The contamination of consumer food and animal feed with toxigenic fungi has resulted in economic losses worldwide in animal industries. Mycotoxins are highly biologically reactive secondary metabolites and can inhibit protein synthesis and cell multiplication. Considering the cytotoxicity of mycotoxins, this experiment was performed to determine the *in vitro* influence of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone on lipid peroxidation in lymphocytes of broiler chickens at different concentrations. This study has also evaluated whether the presence of these mycotoxins changes the acetylcholinesterase activity in lymphocytes, which is involved in the regulation of immune and inflammatory responses. Blood lymphocytes of broiler chickens were isolated through density gradient centrifugation and incubated with the respective mycotoxins at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 µg/mL. Lipid peroxidation, which was evaluated through the amount of malondialdehyde measured in a thiobarbituric acid-reactive species test, and the enzymatic activity were analyzed at 24, 48 and 72 h. Results of the lipid peroxidation evaluation showed an increasing cytotoxicity relation: ochratoxin A > deoxynivalenol > zearalenone. Conversely, cytotoxicity was valued as zearalenone > deoxynivalenol > ochratoxin A in relation to the acetylcholinesterase enzymatic activity. At a concentration of 1 µg/mL, ochratoxin A and deoxynivalenol induced the highest cellular oxidative stress levels and the highest enzymatic activity at the majority of time points. However, the same mycotoxins, except at 1 µg/mL concentration, induced a reduction of lymphocytic lipid peroxidation 72 h after incubation, suggesting the action of a compensatory mechanism in these cells.

Keywords: Cytotoxicity; Enzymatic activity; Oxidative burst; Leucocytes; Lipid peroxidation; Mycotoxins

Introduction

Mycotoxins are fungal secondary metabolites present in 25% of the grains produced worldwide (Santurio 2000). The exposure to these secondary metabolites occurs through the ingestion of contaminated products, leading to a number of serious health problems, including immunosuppression and carcinogenesis (Keller et al. 2005).

Reactive oxygen species (ROS) are associated to several molecular changes on cellular components, resulting in cellular morphology and viability alterations. High levels of ROS may promote cell oxidative damage, such as DNA injury, protein oxidation and lipid peroxidation (Zhang et al. 2009).

Acetylcholinesterase (AChE) is an enzyme present in the lymphocytic membrane and cytoplasm responsible for regulating acetylcholine (ACh), which modulates the activation and differentiation of lymphocytes via extra-neuronal cholinergic system (Wessler and Kirkpatrick 2001). The ACh released by lymphocytes may have immunomodulatory action through muscarinic or nicotinic ACh receptors (Kawashima and Fujii 2000). Since

* Correspondence: janiosanturio@gmail.com

⁵Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisas Microbiológicas (LAPEM), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil

Full list of author information is available at the end of the article

the interaction between ACh and its receptor depends on the catalytic efficiency of AChE, the activity of this enzyme can be used as a rate of the cholinergic function because changes in its activity may indicate alterations in the availability of ACh receptors (Benedetto 1997).

Mycotoxins can induce genotoxic and cytotoxic effects and may be associated to cellular oxidative stress; consequently, the lipid peroxidation induced by mycotoxins could alter the AChE activity. In order to determine and compare the mycotoxin cytotoxicity, lymphocytes of broiler chickens were incubated *in vitro* with different concentrations of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone mycotoxins. Lipid peroxidation levels were analyzed using thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) test, and AChE was quantified.

Materials and methods

Reagents

All reagents used in the experiments were of analytical grade and of the highest purity: acetylthiocholine iodide, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid, tris-(hydroxymethyl)-aminomethane GR, Coomassie brilliant blue G, RPMI 1640 cell culture medium, fetal bovine serum (FBS), penicillin and streptomycin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Mycotoxins

The mycotoxins used were ochratoxin A (OTA), deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). They were solubilized in ethanol (5%) at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1 and 1 µg/mL and were added to lymphocyte cultures for respective assessment.

Cells and culture

Lymphocytes were isolated from broiler chicken blood in accordance with the guidelines for the ethical conduct in the care and use of animals of Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Brazil. The blood pool was collected from jugular vein of 45-day-old Coob 500 lineage poultry using Falcon conical tubes with 10% EDTA, and the cell isolation technique was performed through density gradient centrifugation as described by Boyum (1968). After the counting of cells in a Neubauer chamber, stained with trypan blue 0.1%, concentrations of 0.7×10^5 lymphocytes/mL were cultured in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FBS and 2.5 IU/mL penicillin/streptomycin and maintained at 37°C in 5% CO₂. The suspension of cells was placed in 96-well plates and maintained in exponential growth (80% confluence). Each mycotoxin (20 µL) was added to the cell cultures at different concentrations (0.001, 0.01, 0.1 and 1 µg/mL), and the analysis were carried out 24, 48 and 72 h post incubation.

Sample preparation and protein determination

The number of cells was measured by counting in a Neubauer chamber. Lymphocytes were washed in phosphate buffer (3X), centrifuged for 10 min (1.400 rpm), and then the supernatant was discarded. The pellet was resuspended in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) to a final protein concentration of 0.1 to 0.2 mg/mL. Protein concentration was determined by the Coomassie blue method (Bradford 1976), using bovine serum albumin as a standard.

AChE activity in lymphocytes

The AChE activity was measured by adapting the technique described by Ellman et al. (1961) and modified by Fitzgerald and Costa (1993) to evaluate it in lymphocytes. Briefly, 0.2 mL of each sample was added to a solution containing 1.0 mM acetylthiocholine (AcSCh), 0.1 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and 100 mM phosphate buffer (pH 8.0). Absorbance was read on a spectrophotometer at 412 nm. HBSS was used as a negative control. AChE values were calculated from the AChE activity and the protein content, and results were expressed as nmol of h/mg of protein.

Lipid peroxidation

Cell lipid peroxidation was measured using TBARS levels, as described by Jentzsch et al. (1996). Results were obtained by spectrophotometry at 535 nm and expressed as nmol of MDA/mg of protein.

Statistical analysis

Differences between the treated groups were determined by one-way ANOVA followed by the Newman-Keuls post test, considering $P < 0.05$ as a level significance. The experiment was replicated twice, and the samples were measured in triplicate. Results were expressed as mean \pm standard error of the mean.

Results

Ochratoxin A

After the incubation with OTA mycotoxin, lymphocytic cells showed an increase in malondialdehyde (MDA) production when compared to the control group, which resulted in higher lymphocyte cytotoxicity in a dose-responsive manner in 0.01 µg/mL (15.00 ± 0.57 and 39.26 ± 6.72), 0.1 µg/mL (17.73 ± 1.04 and 42.09 ± 2.41) and 1 µg/mL (24.42 ± 6.21 and 47.86 ± 4.71) concentrations analyzed in the first 48 h. However, the OTA concentration of 0.001 µg/mL did not induce significant MDA levels in lymphocytic cells until 48 h. At 72 h, there was a decrease of these levels, representing lower cell oxidative stress, with the exception of the cells incubated with the concentration of 1 µg/mL (32.97 ± 3.03) ($P < 0.05$). The 0.1 µg/mL concentration induced the

lowest MDA levels (15.43 ± 1.31) in the cells 72 h post-incubation ($P < 0.05$) (Figure 1).

The AChE analysis revealed an increase in the enzymatic activity in lymphocytes incubated with OTA 24 h post-incubation for all concentrations when compared to the control group ($P < 0.05$). After 48 h, only the lymphocytes incubated with the concentration of $0.001 \mu\text{g/mL}$ did not demonstrate significant levels of AChE. After the full period of analysis, this increase remained only in the cells incubated with the concentration of $1 \mu\text{g/mL}$ (4.82 ± 0.57) ($P < 0.05$) (Figure 2).

Deoxynivalenol

Regarding MDA levels in lymphocytes incubated with DON, there was an increase in the lipid peroxidation level observed in all concentrations after 24 h of incubation in comparison with the control group ($P < 0.05$). After 48 h, cell oxidative damage was observed only at the highest concentration, $1 \mu\text{g/mL}$ (45.35 ± 6.31), whereas at 72 h, there was a decrease in the oxidative stress level in the cells incubated with the concentrations $0.001 \mu\text{g/mL}$ (16.50 ± 0.86), $0.01 \mu\text{g/mL}$ (14.65 ± 0.27) and $0.1 \mu\text{g/mL}$ (16.26 ± 1.74) ($P < 0.05$) (Figure 3).

The AChE evaluation at 24 h demonstrated an increase of the enzymatic activity in the cells incubated with DON at all concentrations when compared to the control group ($P < 0.05$), and those incubated with $1 \mu\text{g/mL}$ mycotoxin concentration presented the highest AChE activity (11.08 ± 0.50) ($P < 0.05$). After 48 and 72 h, only the lymphocytes incubated with $1 \mu\text{g/mL}$ mycotoxin concentration presented significant levels of AChE activity, represented respectively by 4.37 ± 0.43 and 4.07 ± 0.69 ($P < 0.05$) (Figure 4).

Zearalenone

The lowest concentrations of mycotoxin (0.001 and $0.01 \mu\text{g/mL}$) caused an increase in MDA levels ($30.00 \pm$

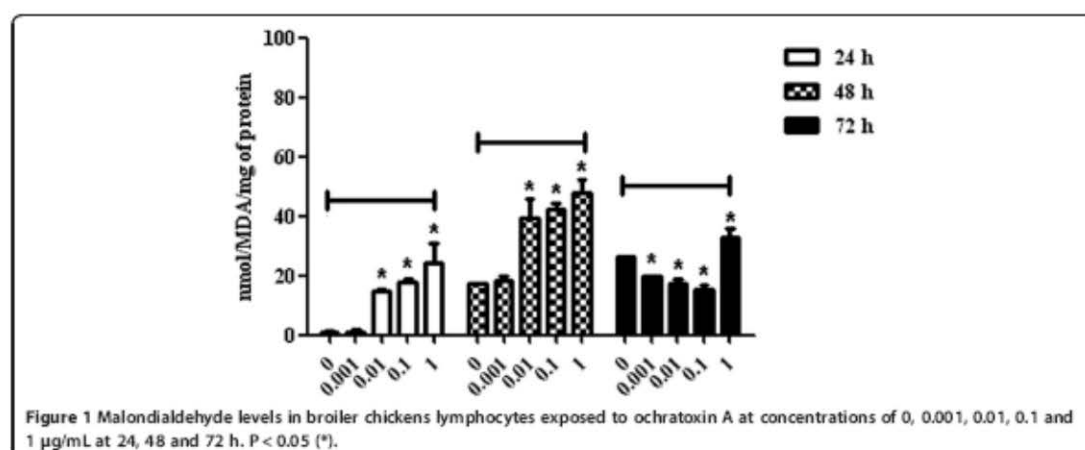
2.88 and 29.18 ± 2.76 , respectively) in lymphocytic cells at 24 h ($P < 0.05$), whereas the $0.1 \mu\text{g/mL}$ concentration caused an increase at 48 h (41.01 ± 3.92) ($P < 0.05$), when compared to the control group. A significant increase in MDA levels was not observed at 72 h, indicating that the oxidative stress was a result of the natural process of cellular oxidation, as observed in the control group (Figure 5).

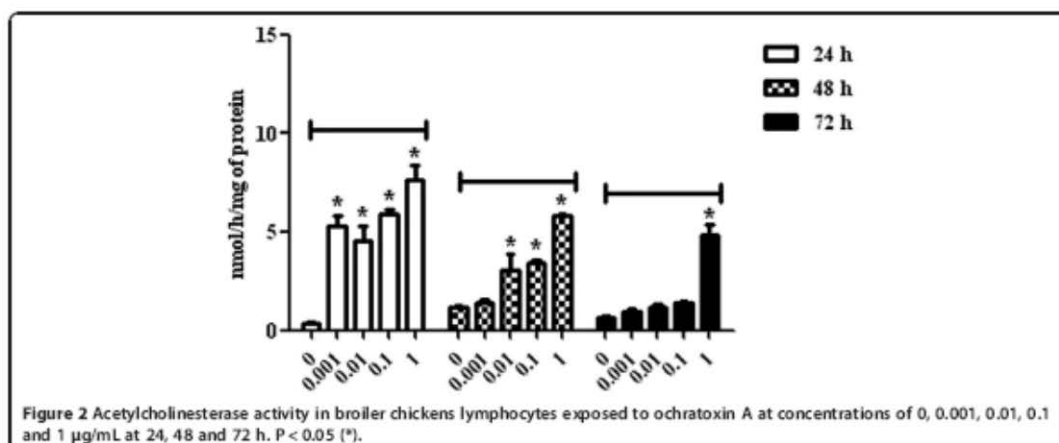
The AChE analysis demonstrated an increase of the enzymatic activity in cells incubated with ZON at $1 \mu\text{g/mL}$ concentration at 24 h (3.41 ± 0.77) ($P < 0.05$) and, at 0.1 (3.18 ± 0.34) and 1 (2.38 ± 0.23) $\mu\text{g/mL}$ concentrations at 48 h ($P < 0.05$). At 72 h, all concentrations of ZON caused an increase of the AChE activity in comparison to the control group ($P < 0.05$) (Figure 6).

Discussion

Oxidative stress is a term used to define the outcome of an imbalance between the prooxidant (ROS) and antioxidant molecules, which results in wide range cell damages. In order to assess oxidative stress, methods that quantify peroxidation products and antioxidant agents are available (Hassen et al. 2007). MDA was chosen as a parameter of oxidative stress and cellular injury in this study because it is an end-product of the lipid peroxidation, which is one of the cellular pathways involved in oxidative damage and it is associated to cytotoxicity induced by mycotoxins (Abid-Essefi et al. 2004).

Despite the effect of the cholinergic system on lymphocytes remains unclear, the demonstration of the existence of cholinergic markers in lymphocytes may help assess the importance of the cholinergic system as a possible regulator of the immune system (Tayebati et al. 2002). In addition to performing lipid peroxidation analysis, this study also evaluated the *in vitro* AChE activity in lymphocytes of broiler chickens after incubation with





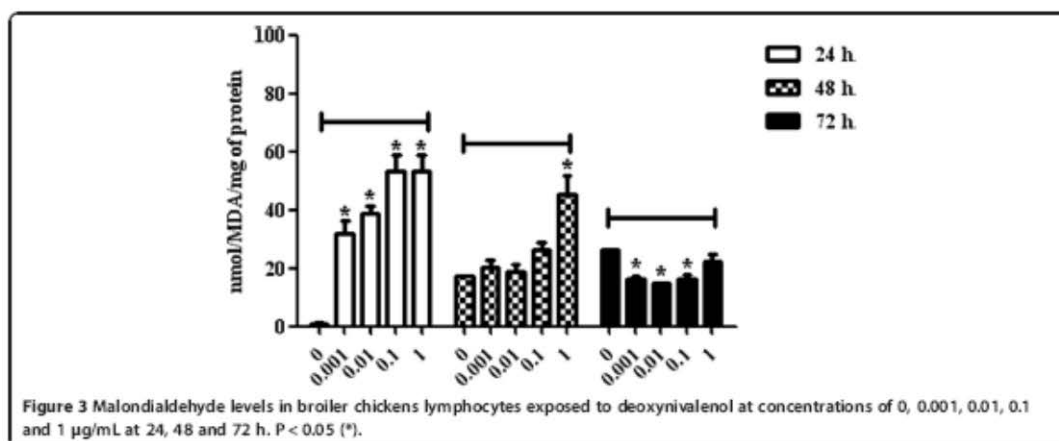
different concentrations of OTA, DON and ZON mycotoxins.

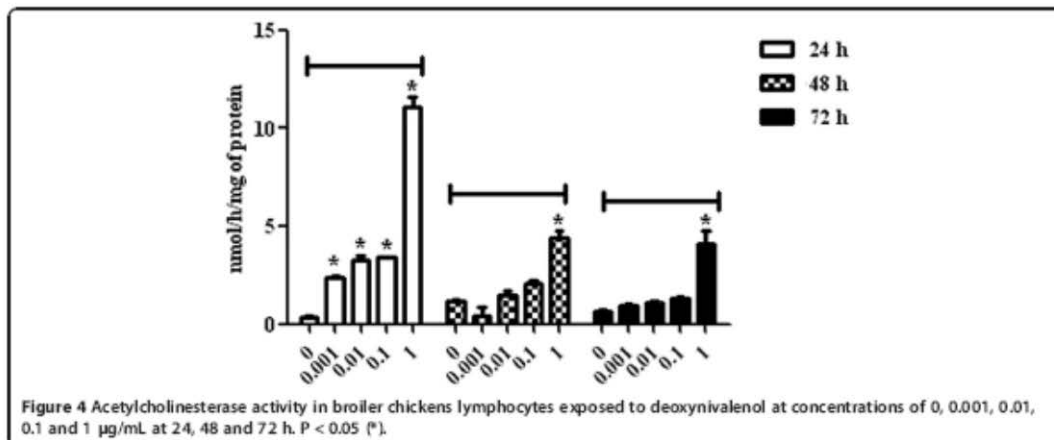
The evaluation of AChE activity revealed DON to be more cytotoxic to the lymphocytes of broiler chickens than OTA and less cytotoxic than ZON. The lymphocytic cells added to 1 µg/mL DON concentration presented the highest levels of AChE activity, and the same result was also observed in the AChE activity analysis post-incubation with OTA.

According to Paterson and Lima (2010), the probable primary biochemical lesions and early cellular events leading to toxic cell injury or cellular deregulation associated with OTA exposure would be in the following sequence: disruption of phenylalanine metabolism, reduction of PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxylase), reduction of gluconeogenesis and cell death. The cell death may occur by two alternative routes: through metabolic activation, inhibition of protein synthesis (DNA) and apoptosis,

or through the alteration of membrane permeability and disruption of calcium homeostasis, leading to cell deregulation. These cellular events could explain the process that occurred mainly in the first 48 h of this study, but they do not justify the decreased oxidative stress levels at 72 h.

The decrease of OTA lipid peroxidation levels within 72 h was similar to that observed in cells incubated with DON, suggesting a compensatory mechanism that is indicative of an autoregulatory process in these immunological cells. According to the study of Kamimura et al. (2003), ACh stimulates nitric oxide synthesis in CCRF-CEM cells (Human T cell lymphoblast-such as cell line), which could be related to increased cytotoxicity. The relation between ACh and AChE is inversely proportional, which means that the higher the activity of AChE, the lower the amount of acetylcholine available in the cell. Thus, unlike the study by Kamimura et al. (2003), our study found no relation between the activity of AChE





with decreased lipid peroxidation 72 h post-incubation of lymphocytes of broiler chickens with OTA and DON, since the cells did not show significant levels of the enzyme.

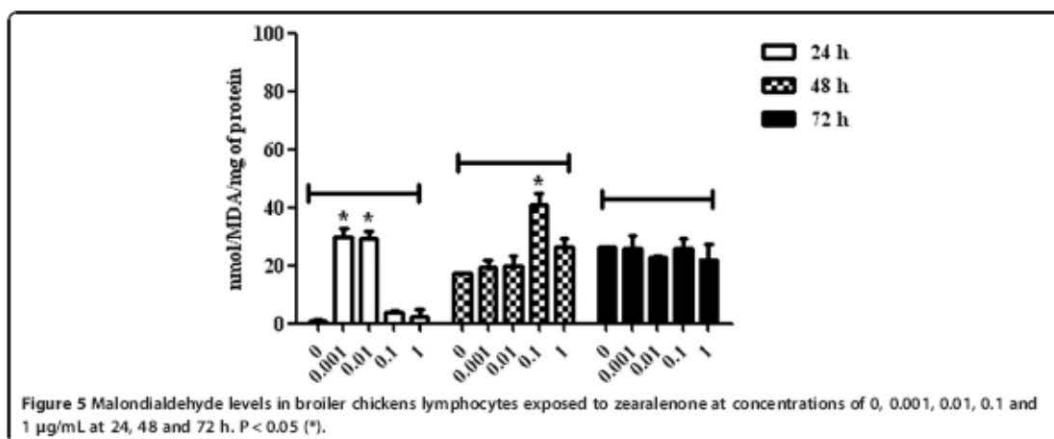
Klarić et al. (2006) observed that OTA at 5 µg/mL induced high levels of stress oxidative in porcine kidney PK15 cells at 24 h, with further significant increase after 48 h exposure, whereas the other concentrations analyzed, 0.5 and 0.05 µg/mL, showed no significant results. Our study demonstrated similar OTA sensitivity to a primary culture of lymphocytes of broiler chickens, but at lower concentrations.

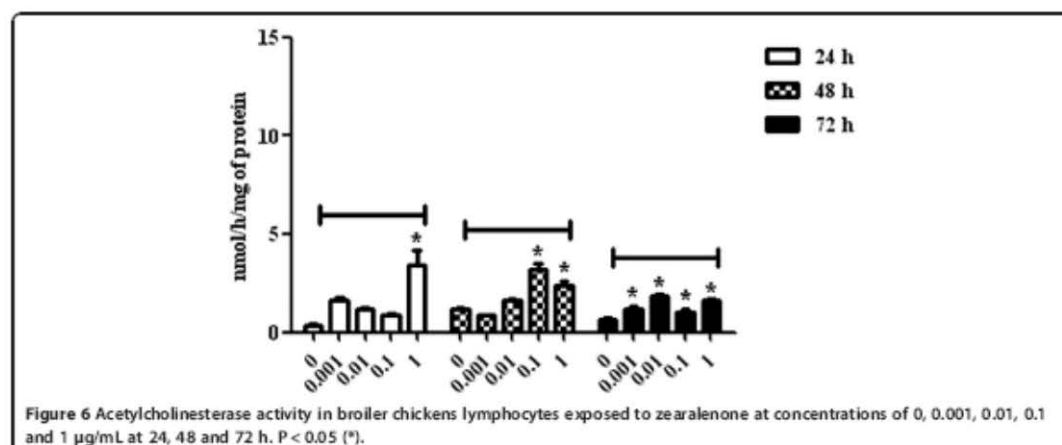
DON has been reported to induce lipid peroxidation using Caco-2 cells (Kouadio et al., 2005) and elevate TBARS levels in a dose-responsive manner in human hepatoma HepG2 cells (Zhang et al., 2009). This production of radical species associated to oxidative stress could cause DNA injury. The same dose-responsive manner showed by

the study of Zhang et al. (2009) was demonstrated in our study only in the first 24 h of analysis.

According to Bondy and Pestka (2000), trichotenes affect the humoral immunity and can act as either stimulators or suppressors of the immune system based on some variables such as the dose, frequency and the time of exposure. In this study, DON demonstrated lower cytotoxicity through lipid peroxidation and higher enzymatic inhibition than did OTA. Compared to zearalenone, DON caused higher lipid peroxidation and lower enzymatic inhibition.

Several studies have demonstrated the cytotoxic effects of ZON, such as the inhibition of cellular proliferation and synthesis of macromolecules in different cell lines (Severino et al. 2008, Abid-Essefi et al. 2004), induction of lipid peroxidation, and cell death (Abid-Essefi et al. 2004). Moreover, genotoxic effects such as apoptosis induction, production of DNA fragmentation (Abid-Essefi et al.





2003, Kim et al. 2003) as well as micronuclei (Ouanes et al. 2003) and chromosome aberrations (IARC International Agency for Research on Cancer 1993, Ouanes et al. 2003) have also been presented.

In poultry, the hepatic biotransformation of the mycotoxin ZON results in the main product β -zearalenol (β -ZOL) (Gajęcki et al. 2010), which is considered an inactivation reaction (Fitzpatrick et al. 1989; Leffers et al. 2001), since β -ZOL is generally three times less estrogenic than α -ZOL (Wyatt 1991). In our *in vitro* study, the ZON analysis in lymphocytes of broiler chickens demonstrated lower cytotoxicity in comparison to the other mycotoxins assessed, since the cells used in our study were not specifically target for ZON. This result was in agreement with the data previously obtained in CHO-K1 cells (Cetin and Bullerman 2005, Ferrer et al. 2009) and in other cell lines (Hassen et al. 2007, Ayed-Boussema et al. 2008, Bouaziz et al. 2008). Nevertheless, Abid-Essefi et al. (2004) showed that ZON induced oxidative damage by enhancing lipid peroxidation on nonspecific target cell line Vero and Caco-2 cells, since the mycotoxin increased MDA formation in a concentration-dependent manner.

Conclusions

In vitro cell culture assays have contributed to mycotoxin research through supplementary information on biochemical mechanisms of cytotoxicity of these metabolites. In the assessment of MDA levels and the consequent lipid peroxidation in lymphocytes of broiler chickens exposed to different concentrations of mycotoxins *in vitro*, cytotoxicity was presented in the following order: OTA > DON > ZON. In relation to the enzymatic activity of AChE, the cytotoxicity assessment was ZON > DON > OTA. The inversely proportional relation of the cytotoxicity assessment of mycotoxins between lipid peroxidation

and AChE activity suggests that the higher the enzymatic activity, the lower the cellular oxidative stress. Nevertheless, this effect did not occur at 1 µg/mL concentration because OTA and DON mycotoxins showed to induce the highest levels of cellular oxidative stress at most of the time points as well as the highest levels of AChE activity.

Regarding OTA and DON mycotoxins, it is important to emphasize that in the final period of assessment, 72 h, there was a decrease in the MDA levels of the lymphocytes of broiler chickens. However, this effect was not observed in cells incubated with the concentration 1 µg/mL, which resulted in less cellular oxidative stress in comparison with the initial periods of 24 and 48 h, suggesting the action of a compensatory mechanism in these cells.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration between all authors. Author CL participated in data collection, laboratory analysis and drafted the manuscript. Authors PW, FCP, CBS and STAL participated in laboratory analysis. Author JASJ helped in the statistical analysis. LF and JMS conceived and designed the study and critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹Setor de Micologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000 Porto Alegre, RS, Brasil. ²Universidade de Cruz Alta (UNICRUZ) –Curso de Medicina Veterinária –Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães – Rodovia Municipal Jacob Della Múa, Km 5.6 –98020-290, Cruz Alta, RS, Brasil. ³Laboratório de Análises Clínicas Veterinário (LACVET), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil. ⁴Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária, 79070-900 Campo Grande, MS, Brasil. ⁵Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil.

Received: 25 April 2014 Accepted: 3 September 2014
Published: 8 September 2014

References

- Abid-Essefi S, Baudrimont J, Hassen W, Ouanes Z, Mobio TA, Anane R, Creppy EE, Bacha H (2003) DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology* 192:237–248
- Abid-Essefi S, Ouanes Z, Hassen W, Baudrimont J, Creppy E, Bacha H (2004) Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol in Vitro* 18:467–474
- Ayed-Boussema I, Bouaziz C, Rjiba K, Valenti K, Laporte F, Bacha H, Hassen W (2008) The mycotoxin zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signalling pathway. *Toxicol in Vitro* 22:1671–1680
- Benedetto G (1997) Drogas que afetam o Sistema Nervoso Parasimpático e Gânglios Autônomos. In: O'Neill JO, Doukas PH (eds) *Farmacologia Clínica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Bondy GS, Pestka JJ (2000) Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Env Health B* 3:109–143
- Bouaziz C, Sharaf el dein O, El Gholi E, Abid-Essefi A, Bierner C, Lemaire C, Bacha H (2008) Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology* 254:19–28
- Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 97:77–89
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Cetin Y, Bullemann LB (2005) Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food Chem Toxicol* 43:755–764
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Feather-Stone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88–95
- Feiner E, Juan-García A, Font G, Ruiz MJ (2009) Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicol in Vitro* 23:1504–1509
- Fitzgerald BB, Costa LG (1993) Modulation of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity in lymphocytes and in brain areas following repeated organophosphate exposure in rats. *Fund Appl Toxicol* 20:210–216
- Fitzpatrick DW, Picken CA, Murphy LC, Buhr MM (1989) Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, α -zearalenol and β -zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp Biochem Phys C* 94:691–694
- Gajęcki M, Gajęcka M, Jakimiuk E, Zielenka E, Obiński K (2010) Zearalenone Biotransformation. In: Rai M, Varma A (eds) *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Springer, Heidelberg, Dordrecht, London, New York, p 137
- Hassen W, Ayed-Boussema I, Oucou AA, Lopez AC, Bacha H (2007) The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells. Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology* 232:294–302
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. In: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. IARC, Lyon, pp 397–444
- Jentsch AM, Bachmann H, Furst R, Biesalski HK (1996) Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Bio Med* 20:251–256
- Kamimura Y, Fujii T, Kojima H, Nagano T, Kawashima K (2003) Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line. *Life Sci* 72:2151–2154
- Kawashima K, Fujii T (2000) Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol Therapeut* 86:29–48
- Keller NP, Tumer G, Bennett JW (2005) Fungal secondary metabolism – from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* 3:937–947
- Kim IH, Son HY, Cho SW, Ha CS, Kang BH (2003) Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett* 138:185–192
- Klarić MS, Pepejnjak S, Domijan A, Petrik J (2006) Lipid peroxidation and glutathione levels in porcine kidney PK15 cells after individual and combined treatment with Fumonisin B1, Beauvericin and Ochratoxin A. *Basic Clin Pharmacol* 100:157–164
- Kouadio JH, Mobio TA, Baudrimont J, Moukha S, Dano SD, Creppy EE (2005) Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B₁ in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* 213:56–65
- Leffers H, Nilsby M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, Jørgensen M (2001) Oestrogenic potencies of zearanol, oestradiol, diethylstilboestrol, bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disruptors. *Hum Reprod* 16:1037–1045
- Ouanes Z, Abid S, Ayed I, Anane R, Mobio T, Creppy E, Bacha H (2003) Induction of micronuclei by zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E. *Mutat Res* 538(1–2):63–70
- Paterson RRM, Lima N (2010) Toxicology of mycotoxins. *Mol Clin Environ Toxicol* 23:1–63
- Sartulio JM (2000) Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. *Rev Bras Cienc Avic* 2(1):1–12
- Severino L, Russo R, Luongo D, De Luna R, Garcia R, Rossi M (2008) Immune effects of four *Fusarium*-toxins (FBI, ZEA, NV, DON) on the proliferation of Jurkat cells and porcine lymphocytes: *in vitro* study. *Vet Res Commun* 32(1):5311–5313
- Tayebati SK, Armenta F, El-Assouad D, Zaccaro D (2002) Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the hippocampus of aged rats. *Mech Ageing Dev* 123:521–528
- Wessler J, Kirkpatrick CJ (2001) Role of non-neuronal and neuronal acetylcholine in the airways. In: Zaagsma J, Meurs H, Roffel AF (eds) *Muscarinic receptors in airways diseases*. Birkhäuser Verlag A G, Basel, pp 25–62
- Wyatt RD (1991) Zearalenone toxicosis (F-2 toxicosis) in poultry. In: Smith JE, Henderson RS (eds) *Mycotoxins and animal foods*. CRC, Athens, pp 588–590
- Zhang X, Jiang L, Geng C, Cao J, Zhong L (2009) The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicol* 54:513–518

doi:10.1186/2193-1801-3-506

Cite this article as: Lautert et al.: Individual *in vitro* effects of ochratoxin A, deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and acetylcholinesterase in lymphocytes of broiler chickens. *SpringerPlus* 2014 **3**:506.

Submit your manuscript to a SpringerOpen® journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

4 DISCUSSÃO

Diversas micotoxinas são citotóxicas para os linfócitos *in vitro*, devido seus efeitos sobre as membranas, incluindo os que envolvem os receptores, e interferência na síntese e função de macromoléculas. A influência de substâncias químicas exógenas nas respostas imunes pode ser altamente variável, aumentando, diminuindo, ou mesmo não afetando a resposta, conforme o método e a concentração empregados. Várias micotoxinas são biologicamente reativas e inibem a síntese proteica ou a multiplicação celular. Desde que as respostas imunes dependem, geralmente da síntese macromolecular e proliferação celular, as micotoxinas são consideradas imunotóxicas. Sendo assim, os linfócitos ou as células periféricas dos principais órgãos linfáticos podem ser modelos eficazes para o estudo de efeitos imunotóxicos *in vitro* (SHARMA, 1993).

LEA et al. (1989) demonstraram que OCRA inibe a proliferação de linfócitos T e B *in vitro*, enquanto que TARANU et al. (2010) demonstraram que as menores concentrações de DON aumentou a proliferação celular em linfócitos de humanos e suínos. Diversas alterações dos parâmetros imunológicos também são associadas com concentrações de ZEA *in vitro*, entre elas, destaca-se a inibição da proliferação linfocitária (ERIKSEN & ALEXANDER, 1998; MURATA et al., 2003). BERNHOFT et al. (2004), em estudo *in vitro*, demonstraram que a mistura de micotoxinas derivadas de *Penicillium*, entre elas, OCRA, induziram proliferação em linfócitos de suínos. Em nosso estudo, demonstramos que as diferentes concentrações utilizadas de DON, OCRA e ZEA não inibiram a proliferação dos linfócitos isolados de frangos de corte. Entretanto, demonstrou-se uma diminuição na atividade da enzima E-ADA.

A redução na atividade de ADA provoca um aumento das concentrações extracelulares de Ado, que é convertida em inosina. Ado atua como um sensor e fornece informações ao sistema imune sobre danos teciduais e alterações inflamatórias agudas (KUMAR & SHARMA, 2009). Além disso, a interação de Ado com os seus receptores ubíquos tem efeitos anti-inflamatórios, tais como a inibição da resposta imune do tipo Th1 (CORDERO et al., 2001; GESSI et al., 2000; VARANI et al., 1997). Desta forma, a diminuição da atividade de ADA, em linfócitos, pode estar relacionada a um mecanismo compensatório, que levaria a um aumento das concentrações extracelulares de Ado, e conseqüentemente, atenuação da inflamação e danos teciduais através de sua ação sobre receptores purinérgicos.

A sinalização purinérgica desempenha uma função essencial na modulação das respostas inflamatória e imunológica através de biomoléculas extracelulares, como os

nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) e os seus derivados nucleosídeos de Ado (RALEVIC & BURNSTOCK, 2003). Evidências indicam que níveis elevados de ATP extracelular atuam através de receptores específicos da superfície celular como agente pró-inflamatório, potencializando a liberação de citocinas pró-inflamatórias (BOURS et al., 2006) por linfócitos ativados (LANGSTON et al., 2003). Esses receptores purinérgicos, quando estimulados, desenvolvem uma modulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, estimulando a resposta Th2 e, conseqüentemente, a produção de citocinas anti-inflamatórias, que protegem contra danos oxidativos teciduais a partir da diminuição da produção de EROs (BOURS et al., 2006). Entretanto, baixos níveis de ATP extracelular desempenham uma função adicional como modulador negativo da imunidade (DI VIRGILIO et al., 2009). O seu produto de degradação, Ado, possui eficiente ação anti-inflamatória e imunossupressora através da inibição da proliferação linfocitária e da secreção de citocinas (DEAGLIO et al., 2007; GESSI et al., 2007). ATP extracelular e Ado são controlados por ecto-enzimas, como E-NTPDase e E-ADA, que se apresentam ancorados na superfície celular, com o seu sítio ativo frente ao meio extracelular (ZIMMERMANN, 2001).

Muitas micotoxinas funcionam como os inibidores de enzimas. Enzimas inibidas incluem a AChE, NF- κ B, proteína quinase, tirosina-quinase, aromatase e sulfatase, metaloproteinases de matriz (MMPs), ciclo-oxigenase, DNA polimerases, topoisomerases e glicosidases (PATERSON & LIMA, 2010). No presente estudo, além de E-ADA, realizou-se a quantificação de AChE, demonstrando alta atividade nos linfócitos incubados com OCRA, DON e ZEA, na maioria das concentrações avaliadas. Atualmente, é evidente que os linfócitos expressam a maioria dos componentes colinérgicos expressos em neurónios e constituem um sistema colinérgico independente. O aumento da atividade de AChE pode estar relacionado a uma tentativa de contrabalançar os elevados níveis de EROs, também encontrados em nossos resultados.

Os efeitos adversos das micotoxinas em células também estão associados ao aumento da produção de radicais livres e EROs, resultando em lesões oxidativas nos tecidos (DVORSKA et al., 2007). O dano oxidativo pode comprometer gravemente a homeostase e viabilidade celular. E também é responsável pela indução de uma série de respostas celulares através da geração de espécies reativas secundárias, levando as células a uma morte auto-programada (DESPOIT & COURATIER, 2002). A forma mais conhecida de morte celular programada é a apoptose, denominada como um programa de suicídio celular fisiológico essencial para o desenvolvimento embrionário, a função do sistema imune e a manutenção da homeostasia em organismos multicelulares (JACOBSON et al., 1997). Apesar de encontrarmos elevados níveis de peroxidação lipídica, através da quantificação de MDA nos

linfócitos incubados com as três micotoxinas avaliadas, nas primeiras 48 h, a viabilidade celular não foi comprometida. A natureza complexa das alternâncias nos parâmetros relacionados com o estresse oxidativo não pode ser facilmente explicada por respostas compensatórias simples e uniformes (SEVEN et al., 2004).

O alvo comum das fusariotoxinas é mitocondrial (KOUADIO et al., 2005), uma das mais importantes vias celulares de produção de EROs e estresse oxidativo (CADENAS & DAVIES, 2000). Estresse oxidativo induzido por DON e a ativação de proteína quinase ativada por mitógeno levam a um fenômeno, conhecido como estresse ribotóxico, no qual DON se liga aos ribossomos, inibindo a síntese proteica (PESTKA et al., 2004). Diversos autores sugerem que a produção de radicais livres, induzida por DON, pode ser um dos mecanismos responsáveis pelos danos na membrana e DNA, portanto, o estresse oxidativo é um fator importante em sua toxicidade. KOUADIO et al. (2005) demonstraram que DON induziu peroxidação lipídica em células Caco-2, similarmente, a ZHANG et al. (2009) que observaram aumento dos níveis de TBARS, índice de peroxidação lipídica celular, de forma dose-dependente em células HepG2 expostas a concentrações de 3,75 a 15 mM de DON, sugerindo que a formação de radicais livres e EROs estão envolvidas nos danos ao DNA e, conseqüentemente, apoptose como mecanismo subjacente desta micotoxina (GALVANO et al., 2001; ZHANG et al., 2009).

Não está bem definido se OCRA atua como uma substância cancerígena genotóxica, ou se sua carcinogenicidade ocorre através de um mecanismo indireto, como a indução de citotoxicidade, dano oxidativo e aumento da proliferação celular. Diversos estudos relatam que OCRA induz estresse oxidativo, aumentando a produção de MDA (RAHIMTULA et al., 1988). Como o dano oxidativo observado durante a citotoxicidade geralmente não é específico (OKADA, 1996), dificulta, com base na análise de MDA, a pressuposição de biomarcadores finais de dano oxidativo, para que se determine se a resposta ao estresse oxidativo é a causa ou a consequência da citotoxicidade. Por outro lado, a expressão de marcadores iniciais do estresse oxidativo pode ser alterada na presença de níveis mais baixos de um agente oxidante e antes do surgimento de marcadores não específicos de oxidação atribuídos à citotoxicidade. Outros mecanismos são propostos para explicar a toxicidade OCRA, entre eles, a inibição da síntese proteica, alteração da atividade mitocondrial, desregulação da homeostasia da glicose, e modificação das vias de transdução de sinal (KUIPER-GOODMAN & SCOTT, 1989).

Em relação à ZEA, estudos recentes demonstraram que ela aumenta a formação de EROs e, conseqüentemente, causa danos oxidativos (YU et al., 2011). O estresse oxidativo promovido por ZEA pode ser um dos principais mecanismos da indução de injúria celular e dano ao DNA pela micotoxina, o que, eventualmente, pode levar à tumorigênese (MARIN et

al., 2013). Apesar das células utilizadas em nossa pesquisa não serem alvo de ZEA, houve um aumento da peroxidação lipídica nas 48 h de análise, embora, quando comparada às outras micotoxinas avaliadas OCRA e DON, tenha apresentado os menores níveis de MDA.

Ainda não está completamente elucidado se as micotoxinas estimulam diretamente a peroxidação lipídica através do aumento da produção de radicais livres, ou se o aumento da susceptibilidade à peroxidação lipídica é o resultado de um sistema antioxidante comprometido (SURAI, 2006).

O sistema imune é considerado o alvo primário de tricotecenos (BONDY & PESTKA, 2000). Estudos anteriores demonstraram que, dependendo da concentração, tricotecenos podem estimular ou suprimir funções imunológicas em animais de produção e laboratório (BONDY & PESTKA, 2000; BEREK et al., 2001). Em geral, altas concentrações de tricotecenos prejudicam a imunidade celular e humoral, causando a inibição da proliferação celular, aumento na produção de IgA, menor resistência à infecções bacterianas e indução de apoptose ou necrose das células imunológicas (ISLAM et al., 1998; PESTKA & BONDY, 1990; RAFAI et al., 1995; YANG et al., 2000).

HINTON et al. (2003), após encontrarem resultados complexos a respeito dos efeitos de AFB₁ sobre linfócitos esplênicos isolados de ratos F344, sugeriram que o sistema imune pode compensar ou reverter, ao menos parcialmente, os efeitos citotóxicos durante os ciclos de "repouso" celular (G₀) em doses menores a 1,6 ppm, o equivalente a 1,6 µg/mL. Tais mecanismos compensatórios poderiam justificar os efeitos de proliferação linfocitária induzidos pelas concentrações, inclusive as mais elevadas, das micotoxinas testadas, durante as 72 h de avaliação, além da reversão dos níveis de MDA demonstrados.

Todas as diferenças, em relação à citotoxicidade das micotoxinas DON, OCRA e ZEA, evidenciadas no presente estudo e nos demais encontrados na literatura, podem ser atribuídas às linhagens celulares utilizadas, aos parâmetros analisados, à presença ou não de soro no meio de cultura, ao período de exposição e às variadas combinações e concentrações de micotoxinas (FERRER et al., 2009; RUIZ et al., 2011).

5 CONCLUSÕES

1- Os ensaios colorimétricos utilizados para avaliação de viabilidade celular e atividade enzimática permitiram adequada comparabilidade dos resultados entre as diferentes micotoxinas. Foi possível correlacionar a proliferação celular ocasionada por determinadas concentrações de OCRA e DON com um decréscimo da atividade de E-ADA em linfócitos de frangos de corte incubados com as respectivas micotoxinas. Tais evidências sugerem que em

concentrações mínimas as micotoxinas testadas não estimularam a atividade da enzima, que possui ação pró-inflamatória e contribui para o processo de imunossupressão e, portanto, evitando um decréscimo na viabilidade celular.

2- Na avaliação dos níveis de MDA e consequente peroxidação lipídica em linfócitos de frangos de corte demonstrou-se a seguinte relação crescente de citotoxicidade: OCRA>DON>ZEA. Enquanto a atividade enzimática de AChE apresentou-se de modo inversamente proporcional: ZEA>DON>OCRA. Esta relação entre a avaliação da peroxidação lipídica e atividade de AChE induzida pelas respectivas micotoxinas sugere que quanto maior a atividade enzimática, menor o estresse oxidativo celular. No entanto, este efeito não ocorreu na concentração de 1 µg/mL de OCRA e DON, que induziram os maiores níveis de estresse oxidativo celular e atividade enzimática na maioria dos períodos analisados.

3- OCRA e DON induziram uma diminuição nos níveis de MDA dos linfócitos de frangos de corte no período de 72 h de incubação, e conseqüentemente, menores níveis de estresse oxidativo celular em comparação com os períodos iniciais de 24 e 48 h, sugerindo a ação de um mecanismo compensatório nestas células. No entanto, este efeito não foi observado em células incubadas com a concentração de 1 µg/mL.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. Saunders Elsevier: Philadelphia, 6 ed., Cap. 1, p. 3-17, 2007.

ABID-ESSEFI, S.; OUANES, Z.; HASEN, W.; BAUDRIMONT, I.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 467-474, 2004.

AL-ANATI, L.; PETZINGER, E. Immunotoxic activity of ochratoxin A. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, p. 79–90, 2006.

ALLCROFT, P.; CARNAGHAN, R.B.A. Groundnut toxicity *Aspergillus flavus* toxin (aflatoxin) in animal products. Preliminary Communication. **Veterinary Record**, v. 74, p. 863-864, 1962.

AMES, B.N. Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. **Free Radical Research**, v. 7, p. 121-128, 1989.

BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.

BEREK, L.; PETRI, I.B.; MESTERHAZY, A.; TEREN, J.; MOLANR, J. Effects of mycotoxins on human immune functions *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 25-30, 2001.

BERNHOF, A.; KEBLYS, M.; MORRISON, E.; LARSEN, H.J.; FLAOYEN, A. Combined effects of selected *Penicillium* mycotoxins on *in vitro* proliferation of porcine lymphocytes. **Mycopathologia**, v. 158, p. 441-450, 2004.

BLALOCK, J.E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunology Today**, v. 15, p. 504-511, 1994.

BONDY, G.S.; PESTKA, J.J. Immunomodulation by fungal toxins. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B**, v. 3, p. 109-143, 2000.

BOUAZIZ, C.; BOUSLIMI, A.; KADRI, R.; ZAIED, C.; BACHA, H.; ABID-ESSEFI, S. The *in vitro* effects of zearalenone and T-2 toxins on Vero cells. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 65, p. 497-501, 2013.

BOUAZIZ, C.; SHARAF EL DEIN, O.; EL GOLLI, E.; ABID-ESSEFI, A.; BRENNER, C.; LEMAIRE, C.; BACHA, H. Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. **Toxicology**, v. 254, p. 19-28, 2008.

BOURS, M.J.; SWENNEN, E.L.; DI VIRGILIO, F.; CRONSTEIN, B.N.; DAGNELIE, P.C. Adenosine 50-triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 358-404, 2006.

BURDITT, S.J.; HAGLER, W.M.Jr.; HAMILTON, P.B. Feed refusal during ochratoxicosis in turkeys. **Poultry Science**, v. 63, p. 2172-2174, 1984.

BURNSTOCK, G. Purinergic signaling – an overview. **Novartis Found Symposium**, v. 276, p. 26-48, 2006.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 222-230, 2000.

CALVERT, T.W.; AIDOO, K.E.; CANDLISH, A.G.; FUAT, A.R. Comparison of *in vitro* cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines. **Mycopathologia**, v. 159, p. 413-419, 2005.

CETIN, Y.; BULLERMAN, L.B. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 755-764, 2005.

CHAROENPORNSOOK, K.; FITZPATRICK, J.L.; SMITH, J.E. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. **Mycopathologia**, v. 143, p. 105-111, 1998.

CHEN, F.; MA, Y.L.; XUE, C.Y.; MA, J.Y.; XIE, Q.M.; WANG, G.H.; BI, Y.Z.; CAO, Y.C. The combination of deoxynivalenol and zearalenone at permitted feed concentrations causes serious physiological effects in young pigs. **Journal of Veterinary Science**, v. 9, p.39-44, 2008.

CLARKE, R.; CONNOLLY, L.; FRIZZELL, C.; ELLIOTT, C.T. Cytotoxic assessment of the regulated, co-existing mycotoxins aflatoxin B₁, fumonisin B₁ and ochratoxin, in single, binary and tertiary mixtures. **Toxicon**, v. 90, p. 70-81, 2014.

CODERO, O.; SALGADO, F.; FERNÁNDEZ-ALONSO, C.; HERRERA, C.; LLUIS, C.; FRANCO, R.; NOGUEIRA, M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 920-930, 2001.

COSTA, A.N.; KEEN, J.N.; WILD, C.P.; FINDLAY, J.B.C. An analysis of the phosphoproteome of immune cell lines exposed to the immunomodulatory mycotoxin deoxynivalenol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, p. 850-857, 2011.

CRISTALLI, G.; COSTANZI, S.; LAMBERTUCCI, C.; LUPIDI, G.; VITTORI, S.; VOLPINI, R.; CAMAIONI, E. Adenosine deaminase: functional implications and different classes of inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 21, n. 2, p.105-128, 2001.

DÄNICKE, S.; UEBERSCHÄR, K.H.; MATTHES, S.; HALLE, I.; VALENTA, H.; FLACHOWSKY, G. Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or *Fusarium* toxin contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. **Poultry Science**, v. 81, p. 1671-1680, 2002.

DEAGLIO, S.; DWYER, K.M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A.; ERAT, A.; CHEN, J.F.; ENJYOJI, K.; LINDEN, J.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K.; STROM, T.B.; ROBSON, S.C. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p. 1257-1265, 2007.

DERSJANT-LI, Y.; VERSTEGEN, M.W.A.; GERRITS, W.J.J. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. **Nutrition Research Reviews**, v. 16, p. 223-239, 2003.

DESJARDINS, A.E. Mechanism of action of trichothecenes. In: ***Fusarium Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology***, APS Press: St. Paul, USA, p. 53-54, 2006.

DESPORT, J.C.; COURATIER, P. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nutrition Clinique et Metabolisme**, v. 16, p. 253-259, 2002.

DESROSIERS, M.D.; KATHERINE, M.C.; FAKIR, M.J.; STEPHENS, L.A.; JAMA, F.M.; SHAMELI, A.; MEHAL, W.Z.; SANTAMARIA, P.; SHI, Y. Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 1884-1892, 2007.

DI VIRGILIO, F.; BOEYNAEMS, J.M.; ROBSON, S.C. Extracellular nucleotides as negative modulators of immunity. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 507-513, 2009.

DOI, K.; UETSUKA, K. Mechanisms of mycotoxin-induced dermal toxicity and tumorigenesis through oxidative stress-related pathways. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 27, p. 1-10, 2014.

DUCA, R.C.; MABONDZO, A.; BRAVIN, F.; DELAFORGE, M. *In vivo* effects of zearalenone on the expression of proteins involved in the detoxification of rats xenobiotics. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 98-108, 2010.

DVORSKA, J.E.; PAPPAS, A.C.; KARADAS, F.; SPEAKE, B.K.; SURAI, P.F. Protective effect of modified glucomannans and organic selenium against antioxidant depletion in the chicken liver due to T-2 toxin-contaminated feed consumption. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology**, v. 145, p. 582-587, 2007.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of *in vitro* toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 193-236, 2002.

EL GHISSASSI, F.; BARBIN, A.; NAIR, A.; BARTSCH, H. Formation of 1,N⁶ ethenoadenine and 3,N⁴-ethenocytosine by lipid peroxidation products and nucleic acid bases. **Chemical Research and Toxicology**, v. 8, p. 279-283, 1995.

ENNAMANY, R.; MARZETTO, S.; SABOUREAU, D.; CREPPY, E.E. Lipid peroxidation induced by *Boletus satanas*: implication in m5dC variation in Vero cells related to inhibition of cell growth. **Cell Biology and Toxicology**, v. 11, p. 347-354, 1995.

ERIKSEN, G.S.; ALEXANDER, J. In: Nordic Council of Ministers (Ed.), **Fusarium Toxins in Cereals - A Risk Assessment**, v. 502, Tema Nord: Copenhagen, 1998, p. 7-58.

ERIKSEN, G.S.; PETTERSSON, H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 114, p. 205-239, 2004.

ERIKSEN, G.S.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J.E. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. **Archiv für Tierernährung**, v. 57, p. 335-345, 2003.

FALLER, C.; BRACHER, M.; DAMI, N.; ROGUET, R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. **Toxicology in Vitro**, v. 16, p. 557-572, 2002.

FERRER, E.; JUAN-GARCÍA, A.; FONT, G.; RUIZ, M.J. Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1504-1509, 2009.

FORNELLI, F.; MINERVINI, F.; MULE, G. Cytotoxicity induced by nivalenol, deoxynivalenol, and fumonisin B₁ in the SF-9 insect cell line. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 40, p. 166-171, 2004.

FRANCO, R.; CASADÓ, V.; CIRUELA, F.; SAURA, C.; MALLOL, J.; CANELA, E.I.; LLUIS, C. Cell surface adenosine deaminase: much more than an ectoenzyme. **Progress in Neurobiology**, v. 52, n. 4, p. 283-294, 1997.

GALTIER, P.; ALVINERIE, M.; CHARPENTEAU, J.L. The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. **Food and Cosmetics Toxicology**, v. 19, p. 735-738, 1981.

GALVANO, F.; PIVA, A.; RITIENI, A.; GALVANO, G. Dietary strategies to counteract the effects of mycotoxins: A review. **Journal of Food Protection**, v. 64, p. 120-131, 2001.

GHAREEB, K.; AWAD, W.A.; BÖHM, J. Ameliorative effect of a microbial feed additive on infectious bronchitis virus antibody titer and stress index in broiler chicks fed deoxynivalenol. **Poultry Science**, v. 91, p. 800-807, 2012.

GEIGER, J.D.; NAGY, J.I. Lack of adenosine deaminase deficiency in the mutant mouse wasted. **FEBS Letters**, v. 208, n. 2, p. 431-434, 1986.

GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; FOGLI, E.; SACCHETTO, V.; BENINI, A.; LEUNG, E.; MAC-LENNAN, S.; BOREA, P.A. Adenosine and lymphocyte regulation. **Purinergic Signal**, v. 3, p. 109-116, 2007.

GESSI, S.; VARANI, K.; MERIGHI, S.; ONGINI, E.; BOREA, P.A. A_(2A) adenosine receptors in human peripheral blood cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, n. 1, p. 2-11, 2000.

GORGUNER, M.; CERCI, M.; GORGUNER, I. Determination of adenosine deaminase activity and its isoenzymes for diagnosis of pleural effusions. **Respirology**, v. 5, p. 321-324, 2000.

GOYARTS, T.; DÄNICKE, S.; BRÜSSOW, K.P.; VALENTA, H.; UEBERSCHÄR, K.H.; TIEMANN, U. On the transfer of the *Fusarium* toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from sows to their fetuses during days 35–70 of gestation. **Toxicology Letters**, v. 171, p. 38-49, 2007.

HAMILTON, P.B.; HUFF, W.E.; HARRIS, J.R.; WYATT, R.D. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. **Poultry Science**, v. 51, p. 1832-1841, 1982.

HASHIKAWA, T.; HOOKER, S.W.; MAJ, J.G.; KNOTT-CRAIG, C.J.; TAKEDACHI, M.; MURAKAMI, S.; THOMPSON, L.F. Regulation of adenosine receptor engagement by ecto-adenosine deaminase. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, p. 131-133, 2004.

HASSEN, W.; AYED-BOUSSEMA, I.; AZQUETA OSCOZ, A.; DE CERAIN LOPEZ, A.; BACHA, H. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. **Toxicology**, v. 232, p. 294-302, 2007.

HINTON, D.M.; MYERS, M.J.; RAYBOURNE, R.A.; FRANCKE-CARROLL, S.; SOTOMAYOR, R.E.; SHADDOCK, J.; WARBRITTON, A.; CHOU, M.W. Immunotoxicity of aflatoxin B₁ in rats: Effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study. **Toxicological Sciences**, v. 73, p. 362-377, 2003.

HUFF, W.E.; KUBENA, L.F.; HARVEY, R.B. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 67, p. 1139-1146, 1988.

HUSSEIN, H.S.; BRASEL, J.M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, p. 101-134, 2001.

ISLAM, Z.; NAGASE, M.; OTA, A.; UEDA, S.; YOSHIZAWA, T.; SAKATO, N. Structure-function relationship of T-2 toxin and its metabolites in inducing thymic apoptosis *in vivo* in mice. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, p. 1492-1497, 1998.

JACOBSON, M.D.; WEIL, M.; RAFF, M.C. Programmed cell death in animal development. **Cell**, v. 88, p. 347-354, 1997.

KAISER, P. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v. 39, n. 5, p. 309-324, 2010.

KALAISELVI, P.; RAJASHREE, K.; PRIYA, L.B.; PADMA, V.V. Cytoprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against deoxynivalenol-induced toxicity through anti-oxidative and anti-inflammatory mechanisms in HT-29 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 110-118, 2013.

KAMIMURA, Y.; FUJII, T.; KOJIMA, H.; NAGANO, T.; KAWASHIMA, K. Nitric oxide (NO) synthase mRNA expression and NO production via muscarinic acetylcholine receptor-mediated pathways in the CEM, human leukemic T-cell line. **Life Sciences**, v. 72, p. 2151-2154, 2003.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sciences**, v. 74, p. 675-696, 2003.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 2063-2085, 2004.

KÖNIGS, M.; LENCZYK, M.; SCHWERDT, G.; HOLZINGER, H.; GEKLE, M.; HUMPF, H.U. Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture. **Toxicology**, v. 240, p. 48-59, 2007.

KÖSE, K.; YAZICI, C.; ASSIOGLU, O. The evaluation of lipid peroxidation and adenosine deaminase activity in patients with Behcet's disease. **Clinical Biochemistry**, v. 34, n. 2, p. 125-129, 2001.

KOUADIO, J.H.; MOBIO, T.A.; BAUDRIMONT, I.; MOUKHA, S.; DANO, S.D.; CREPPY, E.E. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B₁ in human intestinal cell line Caco-2. **Toxicology**, v. 213, p. 56-65, 2005.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. **Biomedical and Environmental Sciences**, v. 2, p. 179-248, 1989.

KUMAR, V.; SHARMA, A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. **The European Journal of Pharmacology**, v. 616, p. 7-15, 2009.

LANGSTON, H.P.; KE, Y.; GEWIRTZ, A.T.; DOMBROWSKI, K.E.; KAPP, J.A. Secretion of IL-2 and IFN- γ , but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. **The Journal of Immunology**, v. 170, p. 2962-2970, 2003.

LEA, T.; STEIEN, K.; STORMER, F.C. Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. **Mycopathologia**, v. 107, p. 153, 1989.

LEKSTROM-HIMES, J.A.; GALLIN, J.I. Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes. In: Mackay, I.R.; Rosen, F.S. (eds.). **Advances in immunology**, v.343, p.1703-1712, 2000.

LEWIS, C.W.; SMITH, J.E.; ANDERSON, J.G.; FRESHNEY, R.I. Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines *in vitro* via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay. **Mycopathologia**, v. 148, p. 97-102, 1999.

LI, D.; YE, Y.; LIN, S.; DENG, L.; FAN, X.; ZHANG, Y.; DENG, X.; LI, Y.; YAN, H.; MA, Y. Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells *in vitro*: Cell-cycle arrest, oxidative stress, and apoptosis. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 37, p. 141-149, 2014.

MAENETJE, P.W.; VILLIERS, N.; DUTTON, M.F. The use of isolated human lymphocytes in mycotoxin cytotoxicity testing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, p. 1515-1526, 2008.

MARIN, D.E.; PISTOL, G.C.; NEAGOE, I.V.; CALIN, L.; TARANU, I. Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 408-415, 2013.

MARIN, D.E.; TARANU, I. Overview on aflatoxins and oxidative stress. **Toxin Reviews**, p. 1-12, 2012. DOI: 10.3109/15569543.2012.730092. Acesso em: 24 out. 2012.

MARIN, L.; MURTHA, J.; DONG, W.; PESTKA, J.J. Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in EL-4 thymoma cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 48, p. 379-396, 1996.

MINERVINI, F.; FORNELLI, F.; FLYNN, K.M. Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B₁ in a human erythroleukemia cell line. **Toxicology In Vitro**, v. 18, p. 21-28, 2004.

MONAHAN, F.J.; CRACKEL, R.L.; GRAY, J.I.; BUCKLEY, D.J.; MORRISSEY, P.A. Catalysis of lipid oxidation in muscle model systems by heme and inorganic iron. **Meat Science**, v. 34, p. 95-106, 1993.

MORGULIS, M.S. Imunologia aplicada. In: Macari, M.; Furlan, R.L.; Gonzales, E. (Eds.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. Jaboticabal: FUNEP/UNESP, 2002. 375p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MURATA, H.; SULTANA, P.; SHIMADA, N.; YASHIOKA, M. Structure–activity relationships among zearalenone and its derivatives based on bovine neutrophil chemiluminescence. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 18-20, 2003.

NEUMANN, S.; RAZEN, M.; HABERMEHL, P.; MEYER, C.U.; ZEPP, F.; KIRKPATRICK, C.J.; WESSLER, I. The non-neuronal cholinergic system in peripheral blood cells: effects of nicotinic and muscarinic receptor antagonists on phagocytosis, respiratory burst and migration. **Life Sciences**, v. 80, p. 2361-2364, 2007.

OKADA, S. Iron-induced tissue damage and cancer: the role of reactive oxygen species-free radicals. **Pathology International**, v. 46, p. 311-332, 1996.

OMAR, R.F.; HASINOFF, B.B.; MEJILLA, F.; RAHIMTULA, A.D. Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 1183-1191, 1990.

OSWALD, I.P.; MARIN, D.E.; BOUHET, S.; PINTON, P.; TARANU, I.; ACCENSI, F. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. **Food and Additive Contaminants**, v. 22, p. 354-360, 2005.

PALMA, N.; CINELLI, S.; SAPORA, O.; WILSON, S.H.; DOGLIOTTI, E. Ochratoxin A-induced mutagenesis in mammalian cells is consistent with the production of oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, p. 1031-1037, 2007.

PATERSON, R.R.M.; LIMA, N. Toxicology of mycotoxins. **Molecular, Clinical and Environmental Toxicology**, v. 100, p. 31-63, 2010.

PESTKA, J.J. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. **Food Additives & Contaminants**, v. 24, p. 1-13, 2008.

PESTKA, J.J.; BONDY, G.S. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 68, p. 1009-1016, 1990.

PESTKA, J.J.; UZARSKI, R.L.; ISLAM, Z. Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes. **Toxicology**, v. 206, p. 207-219, 2005.

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

PINTO, V.E.F.; VAAMONDE, G. Hongos productores de micotoxinas em alimentos. **Revista Argentina de Microbiologia**, Buenos Aires, v. 28, n.3, p.147-162, 1996.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; BACHA, H. Genotoxicity of zearalenone, an oestrogenic mycotoxin: DNA adducts formation in female mouse tissues. **Carcinogenesis**, v. 16, p. 2315-2320, 1995.

PFOHL-LESZKOWICZ, A.; MANDERVILLE, R.A. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, p. 61-99, 2007.

PRELUSKY, D.B.; ROTTER, B.A.; ROTTER, R.G. Toxicology of mycotoxins. In: Miller, J.D.; Trenholm, H.L. (Eds). **Mycotoxins in Grain. Compounds Other Than Aflatoxins**. Eagan Press: St. Paul, MN, USA, 1994, p. 359-404.

RAFAI, P.; BATA, A.; VANYI, A.; PAPP, Z.; BRYDL, E.; JAKAB, L.; TUBOLY, S.; TURY, E. Effect of various levels of T-2 toxin on the clinical status, performance, and metabolism of growing pigs. **Veterinary Record**, v. 136, p. 485-489, 1995.

RAHIMTULA, A.D.; BEREZIAT, J.C.; BUSSACCHINI, G.V.; BARTSCH, H. Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 4469-4477, 1988.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Involvement of purinergic signaling in cardiovascular diseases. **Drug News & Perspectives**, v. 16, p. 133-140, 2003.

RAMAKRISHNA, N.; LACEY, J.; SMITH, J.E. *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin B₁ formation in barley grain during interactions with other fungi. **Mycopathologia**, v.136, p. 53-63, 1996.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 4 ed., p.1-703, 2001.

RAZANI-BOROUJERDI, S.;BEHL, M.; HAHN, F.F.; PENA-PHILIPPIDES, J.C.;HUTT, J.; SOPORI, M.L. Role of muscarinic receptors in the regulation of immune and inflammatory responses. **Journal of Neuroimmunology**, v. 194, p. 83-88, 2008.

RINGOT, D.; CHANGO, A.; SCHNEIDER, Y.J.; LARONDELLE, Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemical-Biological Interactions**, v. 159, p. 18-46, 2006.

ROBB, J.; NORVAL, M.; NEILL, W.A. The use of tissue culture for the detection of mycotoxins. **Letters in Applied Microbiology**, v. 10, p. 161-165, 1990.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F.M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 369-378, 2005.

RUIZ, M.-J.; MACÁKOVÁ, P.; JUAN-GARCÍA, A.; FONT, G. Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, 2718-2724, 2011.

SANTURIO, J.M. Micotoxinas e micotoxicoses na avicultura. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.1, 2000.

SEVEN, A.; GUZEL, S.; SEYMEN, O.; CIVELEK, S.; BOLAYIRH, M.; UNCU, M.; BURCAK, G. Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in streptozotocin induced diabetic rats: investigation of liver and plasma. **Yonsei Medical Journal**, v. 45, 703-710, 2004.

SHARMA, R.P. Immunotoxicity of Mycotoxins. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 892-897, 1993.

SIDDIQUE, Y.H.; ARA, G.; AFZAL, M. Estimation of lipid peroxidation induced by hydrogen peroxide in cultured human lymphocytes. **Dose-Response**, v. 10, p. 1-10, 2012.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. In: Sies, H. (Ed.). **Oxidative Stress**. Academic Press: London, Cap. 1, p. 1-8, 1985.

SURAI, P.F. Selenium and mycotoxins. In: Surai, P.F. (Ed.). **Selenium in Nutrition and Health**. Nottingham University Press: Nottingham, UK, p. 317-347, 2006.

TARANU, I.; MARINA, D.E.; BURLACU, R.; PINTON, P.; DAMIAN, V.; OSWALD, I.P. Comparative aspects of *in vitro* proliferation of human and porcine lymphocytes exposed to mycotoxins. **Archives of Animal Nutrition**, v. 64, n. 5, p. 383-393, 2010.

TAYEBATI, S.K.; EL-ASSOUAD, D.; RICCI, A.; AMENTA, F. Immunological and immunocytochemical characterization of cholinergic markers in human peripheral blood lymphocytes. **Journal of Neuroimmunology**, v. 132, p. 147-155, 2002.

TIEMANN, U.; DÄNICKE, S. *In vivo* and *in vitro* effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: A review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 24, n. 3, p. 306-314, 2007.

VACA, C.E.; WILHELM, J.; HARTWIG, A.; HARMS-RINGGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research**, v. 195, p. 137-149, 1988.

VAN DER MERWE, K.J.; STEYN, P.S.; FOURIE, L.; SCOTT, D.B.; THERON, J.J. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. **Nature**, v. 205, p. 1112-1113, 1965.

VARANI, K.; GESSI, S.; DALPIAZ, A.; ONGINI, E.; BOREA, P.A. Characterization of A2A adenosine receptors in human lymphocyte membranes by [³H]-SCH 58261 binding. **British Journal of Pharmacology**, v, 122, n. 2, p. 386-392, 1997.

VOSSEN, E.; NTAWUBIZI, M.; RAES, K.; SMET, K.; HUYGHEBAERT, G.; ARNOUITS, S.; SMET, S. Effect of dietary antioxidant supplementation on the oxidative status of plasma in broilers. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, p. 198-205, 2011.

WANG, H.W.; WANG, J.Q.; ZHENG, B.Q.; LI, S.L.; ZHANG, Y.D.; LI, F.D.; ZHENG, N. Cytotoxicity induced by ochratoxin A, zearalenone, and α -zearalenol: Effects of individual and combined treatment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 217-224, 2014.

WANG, Y.C.; DENG, J.L.; XU, S.W.; PENG, X.; ZUO, Z.C.; CUI, H.M.; WANG, Y.; REN, Z.H. Effects of zearalenone on IL-2, IL-6, and IFN- γ mRNA levels in the splenic lymphocytes of chickens. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-5, 2012. DOI:10.1100/2012/567327

WANG, Y.M.; WANG, H.J.; PENG, S.Q. *In ovo* exposure of a *Fusarium* mycotoxin butenolide induces hepatic and renal oxidative damage in chick embryos, and antioxidants provide protections. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 1354-1359, 2009.

WESSLER, I.K.; KIRKPATRICK, C.J. The Non-neuronal Cholinergic System: an Emerging Drug Target in the Airways. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, p. 423-434, 2001.

WIDESTRAND, J.; LUNDH, T.; PETTERSSON, H.; LINDBERG, J.E. Cytotoxicity of four trichothecenes evaluated by three colorimetric bioassays. **Mycopathologia**, v. 147, p. 149-155, 1999.

WOOD, G.E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3941-3949, 1992.

WU, Z.; KAISER, P. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. **Immunobiology**, p. 216, p. 1177-1183, 2011.

YANG, G.H.; JARVIS, B.B.; CHUNG, Y.J.; PESTKA, J.J. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: Relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 164, p. 149-160, 2000.

YONEYAMA, Y.; SAWA, R.; SUZUKI, S.; DOI, D.; YONEYAMA, K.; OTSUBO, Y.; ARAK, T. Relationship between plasma malondialdehyde levels and adenosine deaminase activities in preeclampsia. **Clinica Chimica Acta**, v. 322, n. 1-2, p.169-173, 2002.

YU, J.Y.; ZHENG, Z.H.; SON, Y.O.; SHI, X.; JANG, Y.O.; LEE, J.C. Mycotoxin zearalenone induces AIF- and ROS-mediated cell death through p53- and MAPK-dependent signaling pathways in RAW264.7 macrophages. **Toxicology In Vitro**, v. 25, p. 1654-1663, 2011.

ZHANG, X.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; ZHONG, L. The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. **Toxicol**, v. 54, p. 513-518, 2009.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J.M.; MOLTÓ, J.C.; MANES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1-18, 2007.

ZIMMERMANN, H. Ectonucleotidases: some recent developments and note on nomenclature. **Drug Development Research**, v. 52, p. 44-56, 2001.

7. ANEXOS

ANEXO A- DECLARAÇÃO DA CEA-UFSM



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA EM USO ANIMAL

Santa Maria, 06 de agosto de 2012.

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "*EFEITOS DE MICOTOXINAS SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO DE MATRIZES DE FRANGOS DE CORTE*" sob orientação dos professores Dr. Laerte Ferreiro e Dr. Janio Morais Santurio, não necessita de análise da Comissão de Ética em Uso Animal da UFSM, pois o projeto irá utilizar sangue coletado de frangos de corte no abatedouro Avesui (Santa Maria-RS) no momento da sangria dos mesmos para comercialização, não interferindo no processo de abate dos frangos.

A handwritten signature in cursive script that reads "Roselei Fachinetto". The signature is written in black ink on a white background.

Roselei Fachinetto

Coordenadora da Comissão de Ética em Uso Animal – UFSM

ANEXO B- PROTOCOLO DE SEPARAÇÃO DE LINFÓCITOS DE AVES

REAGENTES: Ficoll-Paque™ Plus®, Tampão hemolítico, PBS estéril.

1. Num tubo falcon de 50ml colocar o sangue.
2. Diluir o sangue total por adição de igual volume (1/2) de PBS e homogeneizar levemente por inversão.
3. Preparar um tubo com 3ml de Ficoll e, cuidadosamente, com uma pipeta de vidro, depositar 6ml do sangue diluído sobre o Ficoll. Evitar misturar o sangue com o Ficoll.
4. Centrifugar a 1.800 rpm por 40 min à temperatura ambiente.
5. Após centrifugar haverá formação de um anel distinto na interface, que deverá ser removido com uma pipeta, evitando pipetar o Ficoll. Colocar a pipeta em contato com a parede do tubo e aspirar em círculo.
6. Transferir o anel de leucócitos + monócitos para um novo tubo e diluir com igual volume de PBS para reduzir a contaminação com o Ficoll. Homogeneizar por inversão.
7. Centrifugar 10 min a 1.500 rpm.
8. Descartar o sobrenadante e adicionar 5ml de tampão para hemólise EDTA-Cloreto de amônio, homogeneizar cuidadosamente e centrifugar por 10 min a 1000 rpm.
9. Descartar o sobrenadante por inversão e analisar se é necessário usar mais tampão, ou seja, se ainda há hemácias. Repetir o processo quantas vezes for necessário.
10. Adicionar ao pellet de linfócitos 5ml de PBS estéril, homogeneizar e centrifugar por 10 min a 1.200 rpm.
11. Descartar o sobrenadante por inversão, soltar o pellet e adicionar 1ml de PBS, homogeneizar e centrifugar por 10 min a 100 rpm.
12. Remover o sobrenadante, rico em plaquetas, e repetir o processo até que não haja mais plaquetas.
13. No sedimento de leucócitos fazer a contagem celular e a avaliação de viabilidade (Câmara de Newbauer).