

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA NA
TOXICIDADE INDUZIDA PELA ZEARALENONA EM
CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Lucian Del Fabbro

Uruguaiana RS, Brasil.

2014

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA NA
TOXICIDADE INDUZIDA PELA ZEARALENONA EM
CAMUNDONGOS**

por

Lucian Del Fabbro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica**

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Uruguaiana, RS, Brasil.

2014

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais).

D349a Del Fabbro, Lucian
Avaliação do efeito do flavonoide crisina na toxicidade
induzida pela zearalenona em camundongos / Lucian Del Fabbro.
86 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2015.
"Orientação: Cristiano Ricardo Jesse".

1. Micotoxina. 2. Flavonoide. 3. Estresse oxidativo. 4.
Processo inflamatório. 5. Apoptose. I. Título.

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**AValiação DO EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA NA TOXICIDADE
INDUZIDA PELA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS**

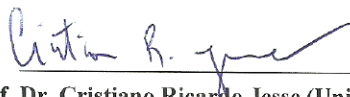
elaborada por

Lucian Del Fabbro

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:



Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse (Unipampa)



Prof. Dr. Juliano Alex Roehrs (UFPEL)



Prof. Dr^a. Ethel Antunes Wilhelm (UFPEL)

Uruguaiana, RS, Brasil.

2015

DEDICATÓRIA

Humildemente, dedico este trabalho a Deus, meu Criador, que me destes o dom do aprendizado.

...DEDICATÓRIA

À minha amada esposa, Nubia Del Fabbro.
Que desde o princípio desta caminhada tem estado ao meu lado.

...DEDICATÓRIA

A minha amada mãe, Marli e ao meu PAI Miro, e a toda a minha família.

...DEDICATÓRIA

Ao meu orientador, Dr. Cristiano Ricardo Jesse, instrumento de transmissão de valiosos aprendizados de cunho científico e pessoal, e a todos os colegas do LaftamBio Pampa, pelo imenso auxílio em todos os momentos..

AGRADECIMENTOS

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo que me capacitou intelectual e emocionalmente para chegar até aqui.

À minha amada esposa Nubia, minha amiga, companheira, incentivadora, fonte de paz e calma, e minha auxiliadora durante todo este período.

Aos meus pais, Miro e Marli, que me deram todo apoio e incentivo fundamentais para a conclusão desta jornada.

Às Prof. Dr^a Ana Flávia Furian, Prof. Dr.^a Marina Venturini e a Prof. Dr^a Larissa Bertan que me inseriram no fascinante ramo da pesquisa, acreditando desde o princípio em meu potencial.

Ao Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, pela orientação, pelo companheirismo, pelo incentivo, por acreditar em minha capacidade, e pela imensa compreensão e cumplicidade aliados a contínuos ensinamentos de cunho científico e pessoal.

Aos colegas de laboratório, Carlos Borges, Marcelo Gomes, André Goes, Leandro Cattelan juntamente com a Prof.^a Marina Prigol e todos os demais colegas de laboratório, por todo o auxílio, companheirismo, compreensão e ensinamentos.

À Unipampa, que me oportunizou a concretização deste projeto.

Aos professores Juliano Alex Roehrs e Ethel Antunes Wilh por aceitarem avaliar e contribuir com este trabalho.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho.

EPIGRAFE

“O único lugar aonde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário.”

(Segredo do Sucesso, Albert Einstein)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica
Universidade Federal do Pampa

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO FLAVONOIDE CRISINA CONTRA TOXICIDADE INDUZIDA PELA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS

Autor: Lucian Del Fabbro
Orientador: Cristiano Ricardo Jesse
Co-orientadora: Marina Prigol

Local e Data da defesa: Itaqui, 2 de Março de 2014.

As micotoxicoses ocorrem através do consumo de alimentos contaminados, sendo uma questão de saúde pública em todo o mundo. A contaminação dos alimentos depende de crescimento fúngico, além de condições climáticas ideais para o desenvolvimento das micotoxinas. A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados destes alimentos. A Zearalenona (ZEA) é uma lactona do ácido fenólico resorcílico e pode ser produzida por várias espécies de *Fusarium*, sendo que *Fusarium graminearum*, *proliferatum* e *culmorum* são os principais produtores. A ZEA é um composto estrogênico, cujo os efeitos tóxicos e seus metabólitos têm sido atribuídos principalmente à sua estrutura química semelhante a dos estrógenos naturais. O sistema reprodutivo é um dos principais alvos de toxicidade da ZEA, sendo os órgãos reprodutores, como útero, ovários e testículos os principais órgãos afetados. Frente a esta problemática, o estudo de substâncias naturais capazes de prevenir tal micotoxicose se faz necessária. A crisina é um flavonoide da classe das flavonas. Possui hidroxila livre nos carbonos 5 e 7 do anel, está presente em níveis elevados no maracujá do mato, mel e no própolis. Possui conhecidos efeitos benéficos como atividades antioxidante e anti-inflamatória, além de aumentar níveis de testosterona. Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito protetor da crisina frente aos efeitos tóxicos da micotoxina ZEA nos testículos de camundongos Swiss. Para isto, os camundongos foram tratados durante 10 dias consecutivos com crisina (5 e 20 mg/Kg, via gavagem), no 11º dia os animais receberam uma dose de ZEA (40 mg/Kg, via gavagem). Após 48 horas, os animais receberam uma dose de pentobarbital (180 mg/Kg, intraperitoneal, i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca e os testículos removidos, pesados e homogeneizados em tampão para as determinações dos níveis de testosterona, contagem e avaliação da motilidade dos espermatozoides, determinação de indicadores de estresse oxidativo por métodos colorimétricos: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glutationa-S-transferase (GST) e não enzimáticos glutationa reduzida, TRAP (capacidade de reatividade antioxidante total) e TAR (capacidade antioxidante total) e 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Foram determinados interleucinas (IL-1 β , IL6 e IL10), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a enzima mieloperoxidase (MPO). Foram determinados parâmetros apoptóticos, as atividades das Caspases 3 e 6 além de dos níveis de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG). O tratamento com crisina reverteu a redução dos níveis de testosterona, da contagem e da motilidade dos espermatozoides. O tratamento com crisina reverteu a inibição das enzimas antioxidantes GPx, GR, e GST, além de normalizar os níveis de GSH e 4-HNE. A alteração nos parâmetros inflamatórios causados pela administração de ZEA foi prevenida pela administração da crisina restaurando os níveis

de IL-1 β e IL-6 e TNF- α e reduzindo os níveis de IL-10 e a atividade da MPO. O tratamento com crisina atenuou os danos apoptóticos causados pela ZEA, inibindo a atividade das caspases 3 e 6 e reduzindo os níveis de 8-OHdG. Desta forma o tratamento com crisina preveniu os danos causados pela micotoxina ZEA em camundongos swiss através da modulação do estresse oxidativo, acarretando em uma redução do processo inflamatório e consequentemente apoptótico. Desta forma espera-se que a crisina possa vir a ser um possível tratamento auxiliar no combate a micotoxicoses seja em humanos ou animais.

Palavras-chave: Micotoxina, flavonoide, estresse oxidativo, processo inflamatório, apoptose.

ABSTRACT

Dissertation of Master
Program of Post-Graduation in Biochemistry
Federal University of Pampa

EVALUATION OF THE EFFECT OF FLAVONOID CHRYSIN AGAINST ZEARALENONE TOXICITY IN MICE

Author: Lucian Del Fabbro
Advisor: Cristiano Ricardo Jesse
Co-advisor: Marina Prigol

Site and Date of Defence: Itaqui, March 2th, 2014.

Ace mycotoxicoses occur through the consumption of contaminated food being a public health issue worldwide. Contamination of food depends on fungal growth beyond the ideal climatic conditions for the development of mycotoxins. The ingestion of mycotoxins by humans occurs primarily by ingestion of contaminated plant products, as well as the consumption of food products derived therefrom. Zearalenone (ZEA) is a phenolic resorcylic acid lactones and can be produced by various *Fusarium* species, and *Fusarium graminearum*, *culmorum* and *proliferatum* are the main producers. ZEA is an estrogenic compound, whose the toxic effects and its metabolites have been mainly attributed to their similar chemical structure of natural estrogens. The reproductive system is one of the main targets of toxicity of ZEA and the reproductive organs such as the uterus, ovaries and testes those most affected organs. Faced with this problem, the study of natural substances capable of preventing such mycotoxicosis is required. Chrysin is a flavonoid of the flavones class. It has free hydroxyl at carbons 5 and 7 ring, is present at high levels in passion fruit bush honey and propolis. Chrysin has known beneficial effects as an antioxidant activities and anti-inflammatory and it has increased testosterone levels. This study aimed to evaluate the protective effect of chrysin forward to the toxic effects of the mycotoxin ZEA in the testes of Swiss mice. For this, the mice were treated for 10 consecutive days with chrysin (5 and 20 mg / kg by gavage) on day 11, the animals received ZEA, a dose (40 mg / kg by gavage). After 48 hours, the animals received an overdose of pentobarbital (180 mg / kg, intraperitoneal, i.p.) and blood was collected by heart puncture and removed, weighed and homogenized testis for determination of testosterone, count and assessment of sperm motility, determination of oxidative stress indicators by colorimetric methods: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and non-enzymatic reduced glutathione, TRAP (reactivity total antioxidant capacity) and TAR (total antioxidant capacity) and 4-hydroxynonenal (4-HNE). Were determined, interleukins (IL-1 β , IL-6 and IL-10), tumor necrosis factor (TNF- α) and mieloperoxidase enzyme (MPO). Apoptotic parameters were determined, Caspases 3 and 6 beyond the levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG). The treatment with chrysin reversed the reduction of testorenone levels, count and motility of sperm. Treatment with chrysin reversed the inhibition of antioxidant enzymes GPx, GR, and GST, as well as normalizing levels of GSH and 4-HNE. The alteration in inflammatory parameters caused by the administration of ZEA was

prevented by administration of chrysin, restoring IL-1 β and IL-6 and reducing IL-10 levels, and reduce TNF- α levels and MPO activity. Treatment with chrysin attenuated apoptotic damage ZEA, inhibiting the activity of caspases3 and 6, reducing levels and 8-OHdG. Thus, the treatment with chrysin prevented the damage caused by mycotoxins ZEA in Swiss mice probably through modulation of the oxidative stress, resulting in a reduction of the inflammatory process and hence apoptosis. Thus it is expected that chrysin may be a possible treatment support combat in mycotoxicosis both in humans and animals.

Keywords: Mycotoxins, flavonoid, oxidative stress, inflammatory process, apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Ilustração do fungo <i>F. graminearum</i>	3
Figura 2: Estrutura química da Zearalenona.....	7
Figura 3: Representação dos metabólitos e principais enzimas envolvidas na biotransformação da ZEA.....	11
Figura 4: Representação esquemática da metabolização e excreção da ZEA em suínos.....	12
Figura 5: Estrutura básica dos flavonoides.....	15
Figura 6: Estrutura básica da crisina.....	16

Manuscrito

Figure 1: Experimental design	46
Figure 2: Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on (A) number of spermatozoa in epididymis ($F(1,32) = 4.12; p < 0.01$) and (B) percentage of motile spermatozoa ($F(1,32) = 12.78; p < 0.001$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 7$ animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group. # Indicates a significant difference compared with control group.....	47

Figure 3: Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on plasmatic levels of testosterone (F (1,32) = 18.94; p<0.01). Data are mean \pm S.E.M. for n = 7 animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. # Indicates a significant difference compared with control group.....48

Figure 4: Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on serum levels of IL-1 β (4A) (F (1,32) = 10.90; p<0.01), IL- 6 (4B) (F (1,32) = 37.17; p<0.001), IL-10 (4C) (F (1,32) = 16.64; p< 0.01), TNF- α (4D) (F (1,32) = 20.47; p<0.001) and MPO activity (4E) (F (1,32) = 22.52; p<0.001). Data are mean \pm S.E.M. for n = 7 animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group # Indicates a significant difference compared with control group.....70

Figure 5: Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on caspase 3 (5A) (F (1,32) = 21.89; p<0.001) and caspase 9 activities (5B) (F (1,32) = 26.88; p<0.001). Data are mean \pm S.E.M. for n = 7 animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group # Indicates a significant difference compared with control group.....71

Figure 6: Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on levels of 4-HNE (6A) (F (1,32) = 14.86; p<0.001) and 8-OHdG (6B) (F (1,32) = 15.30; p<0.001). Data are mean \pm S.E.M. for n = 7 animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group. # Indicates a significant difference compared with control group.....72

LISTA DE TABELAS**Manuscrito**

Table 1 Effect of chrysin on activity antioxidant enzymes (GPx, GT, GST, CAT and SOD) in testis of male mice exposed to ZEA75

Table 2. Effect of chrysin on levels non-enzymatic antioxidants (GSH, GSSG, Ratio GSH/GSSG, TRAP and TAR) in testis of male mice exposed to ZEA76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ZEA, Zearalenona; CAT, catalase; SOD, Superóxido dismutase; GPx, Glutaciona peroxidase; GR, Glutaciona redutase; GST, Glutaciona-S-Transferase; TRAP, Capacidade de reatividade antioxidante total; TAR, Capacidade antioxidante total; 4-HNE, 4-Hidroxynonenal; 8-OHdG, 8-Hidroxy-2'-deoxyguanosina; IL-1 β , Interleucina 1 beta; IL-6, Interleucina 6; IL-10, Interleucina 10; TNF- α , Fator de necrose tumoral alfa; MPO, Mieloperoxidase; KA, Constante cinética; $\alpha - \beta$ ZOL, $\alpha - \beta$ Zearalenol; ZAN, Zearalanona; HSD, 3 α e 3 β hidroxisteroide desidrogenase; UDFGT, Glucoronil difosfato uridina transferase; NADH, Dinucleotídeo de nicotinamina reduzido; OMS, Organização mundial da saúde; ERs , receptores de estrógeno.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	iv
AGRADECIMENTOS	viii
EPÍGRAFE	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Fungos Micotoxigênicos.....	2
2.2 Gênero Fusarium.....	2
2.3 Metabolitos secundários: Micotoxinas.....	3
2.4 Zearalenona.....	6
2.4.1 Características da ZEA.....	6
2.4.2 Zearalenona: Ocorrência e condições de desenvolvimento.....	8
2.4.3 Zearalenona: Toxicocinética e Toxicodinâmica.....	9
2.4.4 Modo de ação e sinais clínicos em animais.....	14
2.5 Flavonoides.....	15
2.6 Crisina.....	16
2.6.1 Propriedades bioativas da crisina.....	17
2.6.2 Biodistribuição, Metabolismo e Eliminação da Crisina.....	17
3 OBJETIVOS	18
3.1 Objetivos Gerais.....	19
3.1 Objetivos Específicos	19
4 MANUSCRITO	20
Abstract	22
1 Introduction	23
2 Materials and methods	25
2.1 Animals and Reagents	25
2.2 Treatment.....	25
2.3 Number and motility of spermatozoa).....	26

2.4 Plasma Testosterone levels.....	26
2.5 Glutathione Peroxidase (GPx) activity).....	26
2.6 Glutathione Redutase (GR) activity.....	27
2.7 Glutathione-S-transferase (GST) activity.....	27
2.8 Catalase (CAT) activity.....	27
2.9 Superoxide dismutase (SOD) activity.....	28
2.10 Fluorimetric Assay of Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) glutathione.....	28
2.11 Total reactive antioxidant capacity (TRAP) and total antioxidant capacity (TAR).....	29
2.12 Cytokines assay.....	29
2.13 Myeloperoxidase (MPO) activity.....	29
2.14 Caspase (3 and 9) activity assay.....	30
2.15 Measurement of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-OHdG).....	30
2.16 Protein determination.....	30
2.17 Statistical Analysis.....	30
3 Results	31
3.1 Number and motility of spermatozoa	31
3.2 Plasma Testosterone levels.....	31
3.3 Antioxidant enzyme (GPx, GR, GST, CAT and SOD) activities.....	31
3.4 Non-enzymatic antioxidants levels (GSH, GSSG, ratio GSH/GSSG, TRAP and TAR).....	32
3.5 Cytokines quantization (IL-1 β , 6, 10, TNF- α) and MPO activity.....	32
3.6 Caspase (3 and 9) activities.....	42
3.7 Measurement of 4-HNE and 8-OHdG levels.....	33
4 Discussion.....	33
5 Conclusion.....	37
Conflict of interest.....	37
6 References.....	38
Legends.....	44
Figures.....	46
Tables.....	52
5 CONCLUSÕES.....	55

6 PERSPECTIVAS.....	56
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
ANEXO A - Protocolo de aprovação do projeto pela CEUA-UNIPAMPA.....	65

1 INTRODUÇÃO

A exposição humana às micotoxinas através do consumo de alimentos é uma questão de saúde pública em todo o mundo (Sun et al., 2014). A contaminação dos alimentos depende de crescimento fúngico e pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto (Zinedine et al., 2007). A ingestão de micotoxinas por seres humanos ocorre principalmente pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados dos alimentos, como o leite, os ovos e a carne (Sun et al., 2014). Os surtos de micotoxicoses são normalmente sazonais, devido a condições climáticas particulares que favorecem o crescimento fúngico e/ou a produção de toxinas. Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genotoxicidade, podendo chegar à morte (Wang et al., 2010).

O Brasil, na posição de um dos países líderes na produção de alimentos agrícolas, possui condições ambientais favoráveis para o crescimento de fungos micotoxigênicos. Atualmente, cerca de 25% de todos os produtos agrícolas produzidos no mundo estão contaminados com alguma micotoxina. Além disso, um dos agravantes é que as micotoxinas são compostos estáveis, resistentes ao armazenamento, cozimento e ao processamento (Köppen et al., 2012). Frente à problemática das micotoxinas, atualmente têm-se dado ênfase aos compostos naturais como os flavonoides, pois possuem atividades antioxidante, anti-carcinogênica, anti-viral, anti-inflamatória e anti-estrogênica ou estrogênica (Ciftci et al., 2012).

Dentre as micotoxinas de maior relevância toxicológica, a ZEA se destaca por ser uma micotoxina estrogênica com importantes efeitos reprodutivos, carcinogênicos, hepatotóxicos e mutagênicos em várias espécies animais (Wang et al., 2010). A elucidação dos efeitos tóxicos da ZEA bem como o estudo de alternativas terapêuticas torna-se importante. Uma forma de tentar minimizar os efeitos deletérios desta micotoxina é através do estudo de substâncias com efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios, como a crisina.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fungos Micotoxigênicos

Os gêneros de fungos filamentosos responsáveis pela produção de micotoxinas consideradas mais relevantes para a saúde são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. A relação entre a micotoxina e o fungo produtor não é única uma dada micotoxina pode ser produzida por espécies diferentes, e um dado fungo pode produzir várias micotoxinas. A ligação entre as espécies e as micotoxinas foi frequentemente obscurecida pela má identificação das estirpes ou das micotoxinas ao longo do tempo. No entanto, esforços de vários investigadores em diferentes grupos taxonômicos, permitiram clarificar a produção de micotoxinas pelas espécies (Serra, 2005).

2.2 Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é frequentemente isolado de grãos de cereais sendo composto por uma grande variedade de espécies fitopatogênicas e sapróbias do solo. Sua posição taxonômica é definida atualmente como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae, Gênero *Fusarium* (Luca, 2007).

Como a maioria dos fungos, estes se dispersam através de seus propágulos por ação de chuva, ventos e animais. Como fungos fitopatogênicos, podem causar cancro em brotos, lesão em galhos e obstrução em inflorescências (Wang et al., 2014).

As espécies mais comumente isoladas como agentes patogênicos no homem e nas plantas são *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum*, *F. chlamidosporum*, *F. equiseti*, *F. semitectum*, *F. anthophilum*, *F. graminearum*, entre outras (Kwon-Chung & Bennett, 1992).

A característica micromorfológica principal deste gênero é a forma de foice de seus conídios. Eles emergem de células conidiogênicas (fiálides) e podem apresentar-se isoladamente ou agrupados em massas crescendo diretamente do micélio (Fischer et al., 1982; Lacaz, 1998).

O fungo *F. graminearum* também conhecido por *Gibberella zeae* (figura 1) é responsável pela fusariose do trigo e do milho e sobrevive na forma de ascósporos nos hospedeiros secundários como as plantas, os grãos e os cereais e em sementes na forma de

micélio (Reis & Casa, 1996). A disseminação é favorecida em condições de clima quente e úmido pela formação de peritécios sobre os tecidos infectados (Shurtleff, 1992).

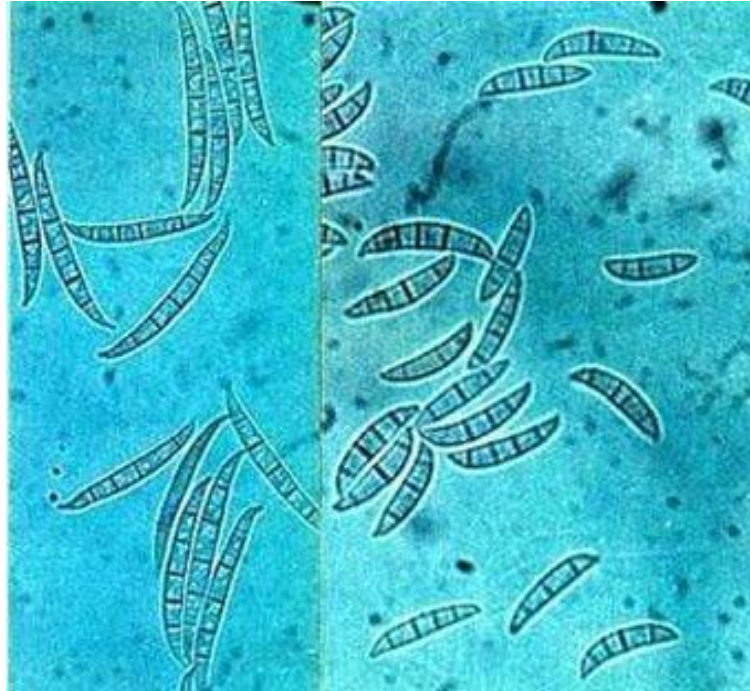


Figura 1: Ilustração do fungo *F. graminearum*

Fonte: Lunes, 2010.

Além dos danos físicos inculcidos às matérias-primas e rações, este gênero afeta a saúde das plantas e animais principalmente pela produção da ZEA (Pitt, 2000), micotoxina muito associada a doenças no trato reprodutor em suínos (Sobrova et al., 2010).

2.3 Metabólitos secundários: Micotoxinas

Os fungos são capazes de produzir em condições naturais e laboratoriais, metabólitos secundários tóxicos. Os metabólitos secundários são compostos biossintetizados e excretados através de um conjunto de vias metabólicas (que constituem o metabolismo secundário), mas que não são essenciais para o crescimento e sobrevivência do organismo, compostos estes denominados micotoxinas (Santin et al., 2005).

As micotoxinas são quimicamente muito estáveis e persistem nos alimentos compostos, mesmo após a remoção dos fungos pelos processos usuais de industrialização e embalagem (Oliveira, 2006). As micotoxinas são responsáveis por perdas econômicas muito

significativas, que podem ser contabilizadas através dos custos das medidas de prevenção contra a contaminação de matérias-primas e alimentos compostos por fungos e micotoxinas, custos de destruição de rações contaminadas, perdas dos índices produtivos em várias espécies animais e tratamentos veterinários aplicados às micotoxicoses agudas ou crônicas (Santin et al., 2005).

As micotoxinas são produzidas por diversos gêneros de fungos, que contaminam produtos agrícolas em toda cadeia de produção alimentar desde o campo, colheita, transporte e armazenamento. As condições de pré e pós-colheita e os cultivos determinam o crescimento de gêneros específicos de fungos. Por estas razões é difícil a adoção de medidas universais para controle de todos estes microrganismos simultaneamente, e também das micotoxinas (Boeira et al., 2012). O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes” que significa fungo e “toxicum” que significa veneno ou toxina (Benett & Klich, 2003). Quando produzidos em associação com alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (Boeira et al., 2014).

A produção de micotoxinas ocorre quando os fungos são submetidos a condições de estresse. Nos grãos armazenados, a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultados da interação complexa entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e fungos. Nas condições de campo, o estresse ocorre por condições climáticas, intempéries, pragas, entre outros, que também resultam em perda de vigor pela planta predispondo-a a colonização por fungos toxigênicos (Santin et al., 2005).

Os impactos econômicos associados às micotoxinas incluem redução na produtividade com prejuízo no agronegócio de muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola, afetando, também, a saúde humana (Leung et al., 2006). Além disso, o crescimento fúngico ocasiona baixo rendimento das culturas e perda nutricional dos grãos com redução do desempenho de animais alimentados com grãos, principalmente o milho (Boeira et al., 2012). Fato que ocasiona danos aos órgãos vitais, aumento da incidência de doenças infecciosas em consequência da imunossupressão, interferência na capacidade reprodutiva, e em casos graves, morte de animais (Cast, 2003). As micotoxinas possuem capacidade genotóxica (IARC, 1999), sendo que seus efeitos negativos na saúde estão diretamente ligados à dose, tempo de exposição, espécie e idade do animal.

As micotoxinas são moléculas um tanto quanto diferentes, com estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando peso molecular de até 50 Da, a grupos de 6 a 8

anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com peso molecular total >500 Da, que não apresentam imunogenicidade, ou seja, não são capazes de induzir ou reagir com os produtos de uma resposta imunológica (Boeira et al., 2014).

As micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo com a eliminação do fungo durante o processamento, as micotoxinas permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou a ração, se torna contaminado por um fungo toxigênico, que em condições adequadas produz as micotoxinas (Santin et al., 2005).

Sabe-se que a maioria dos alimentos e rações pode permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos, tanto durante a produção, quanto durante o processamento, o transporte e o armazenamento (Zinedine et al., 2007). A exposição dos seres humanos às micotoxinas ocorre principalmente pela ingestão a produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados dos animais, tais como leite, queijo, carnes e outros produtos (Santin et al., 2005). Os surtos de micotoxicoses são normalmente sazonais, devido a condições climáticas particulares que favorecem o crescimento fúngico e/ou a produção de toxinas. A umidade e a temperatura são dois fatores críticos. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade e condições de armazenamento também interferem na produção de micotoxinas, sendo que várias toxinas podem ser produzidas simultaneamente (Boeira et al., 2014).

Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genototoxicidade, podendo ocasionar à morte. As micotoxinas podem ainda apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (JECFA, 2001).

A produção de micotoxinas depende do crescimento fúngico, portanto pode ocorrer em qualquer época do crescimento, colheita, ou estocagem do alimento. Contudo, o crescimento do fungo e a presença de toxinas não são sinônimos, porque nem todos os fungos produzem toxinas. Por outro lado as micotoxinas podem permanecer no alimento mesmo após a destruição dos fungos que as produziram. Os gêneros dos fungos mais comumente associados com toxinas que ocorrem, naturalmente, são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Leung et al., 2006). Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* crescem preferencialmente durante o armazenamento dos grãos, e normalmente não causam problemas no campo. Já os fungos do gênero *Fusarium*, infectam os grãos na lavoura, são fitopatógenos, necessitam de umidade

alta, 20 a 21%, e temperatura amena (Santin et al., 2005). Apesar de menos freqüente, é possível o desenvolvimento de micotoxinas de *Fusarium* na fase pós-colheita (Santin et al., 2005).

Em quase todos os tipos de produtos alimentícios já foram encontrados um ou mais tipos de micotoxinas. Apesar de serem conhecidas centenas de micotoxinas (mais de 300) existem inúmeras micotoxinas relacionadas direta ou indiretamente com a contaminação de alimentos, dentre elas: a patulina, a zearalenona, as aflatoxinas, a ocratoxina, a citrinina, o ácido penicílico, a ergotamina, as fumonisinas e os tricotecenos, sendo as mais importantes quanto à freqüência e especificidade em alimentos as aflatoxinas, a ocratoxina A e a zearalenona (Zinedine et al., 2007).

2.4 Zearalenona

2.4.1 Características da ZEA

A Zearalenona (ZEA– figura 2) é descrita quimicamente como uma lactona do ácido fenólico resorcílico e pode ser produzida por várias espécies de *Fusarium*, sendo que *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium culmorum*, estas espécies são conhecidas por colonizarem cereais e mostrarem tendência a se desenvolverem em baixas temperaturas (Zinedine, 2007). A ZEA é um composto estrogênico, reconhecidamente responsável pela síndrome estrogênica de suínos (Prelusky et al., 1990). Embora a associação entre a exposição à ZEA e o aparecimento de doenças em humanos ainda seja especulativa, a puberdade precoce e a ginecomastia em crianças observadas em Porto Rico foram correlacionadas com a alta concentração de ZEA em alimentos à base de milho consumidos por esta população (Kuiper-Goodman et al., 1987).

A denominação ZEA provém do fungo “*Gibberella zeae*” (forma sexuada do *Fusarium graminearum*), grande produtor desta micotoxina, e também por características da sua estrutura química. A ZEA apresenta uma fluorescência azul-esverdeada, quando excitada com luz ultravioleta de ondas longas de 360 nm e uma fluorescência verde mais intensa quando é excitada com luz ultravioleta de ondas curtas de 254 nm (OMS, 1983). Sua molécula é constituída por uma lactona ácida resorcílica, sendo o radical “- eno” pela dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o “- ona” pela cetona no C6 (Urry et al., 1966), como mostra a Figura 2. Apesar de ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, é estável ao rompimento hidrolítico. Isto é atribuído à presença de um grupo metil secundário que impede que ataques nucleofílicos sejam efetivados na carbonila da lactona.

A ZEA possui características estrogênicas e possui semelhança química com a estrutura do hormônio estrogênico 17β -estradiol, como mostra a figura 3.

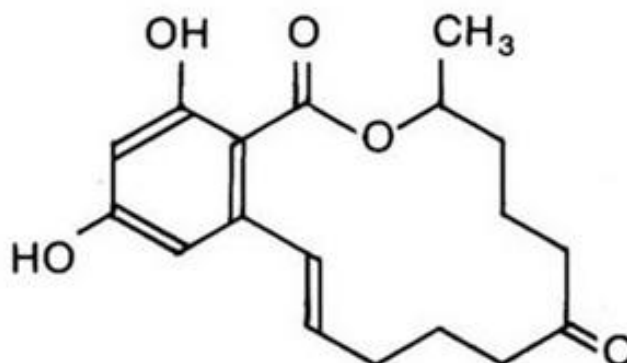


Figura 2: Estrutura química da Zearalenona

Em 1962, Stob et al. isolaram um metabólito ativo com atividade estrogênica e anabólica a partir de culturas de *G. zeae* (*F. graminearum*). O metabólito ativo encontrado em milho com característica estrogênica foi nomeado ZEA, anteriormente conhecido como toxina F-2. Assim, a ZEA foi isolada e caracterizada em 1962 devido à síndrome estrogênica que surgiu em suínos alimentados com rações à base de milho contaminado com *Fusarium graminearum* (Mídio & Martins, 2000). Sua estrutura foi elucidada em 1966 e a síntese total surgiu em 1968 (Merck Index, 2006). A sua ocorrência natural em produtos começou a ser estudada em 1968, desde então observou-se perdas em alguns rebanhos, e a afirmação de que a mortalidade estaria relacionada com prolapsos vaginais e retais e subsequente septicemias prevalecia. Entretanto, a hipótese de que a presença de micotoxinas adicionais também poderiam ser responsáveis pela causa das mortes, não podia ser excluída (Mirocha et al, 1971).

Além do composto principal, pelo menos sete derivados da ZEA já foram encontrados como tendo ocorrência natural no milho. Assim, a ZEA e seus derivados ativos foram classificados como substâncias estrogênicas, no sentido de que eles produzem estros ou cornificação da vagina de camundongos adultos (Mirocha & Christensen, 1974).

O sistema reprodutivo é um dos principais alvos de toxicidade da ZEA (Minervini & Dell'Aquila, 2008). A ZEA tem fortes efeitos estrogênicos e é distribuída principalmente nos órgãos reprodutores, como útero, ovários e testículos.

O primeiro caso de estrogenismo em suínos foi relatado em meados da década de 1920 no centro-oeste dos Estados Unidos (McNutt et al., 1928), pois a condição de inchaço da vagina nas fêmeas jovens e inchaço do prepúcio em machos foi associada ao consumo de milho mofado. O prolapso vaginal e, ocasionalmente, do reto foram observados como efeitos secundários. Com a substituição do milho mofado por um milho de melhor qualidade micológica, os animais recuperavam-se, mas se a exposição ao milho mofado continuasse observava-se reversão do útero e infecções secundárias que levavam à morte de muitos porcos.

A ZEA atua em células germinais masculinas devido à sua capacidade de induzir o estresse oxidativo causando depleção de reservas antioxidantes específicas, como a enzima GST (Boeira et al., 2012). Camundongos machos expostos à ZEA apresentaram uma diminuição significativa no peso corporal, peso de testículos e no peso das vesículas seminais e da próstata. Além disso, a contagem de espermatozoides e os percentuais de motilidade espermática diminuíram nos animais expostos à ZEA (Salah-Abbes et al., 2009).

2.4.2 ZEA: ocorrência e condições de desenvolvimento

A ZEA pode ser produzida em substratos diversos, incluindo trigo, cevada, milho, silagem de milho, arroz, sorgo, e, ocasionalmente, nas forragens. No entanto, o milho é o vegetal mais susceptível à contaminação pelos fungos fitopatogênicos do gênero *Fusarium* (Kumar et al., 2008) que produzem uma série de micotoxinas, sendo a ZEA frequentemente encontrada neste grão (Salay & Mercadante, 2002). A presença de oxigênio e o teor de umidade são fatores críticos para produção de ZEA. Em culturas de laboratório, o crescimento do gênero *Fusarium* ocorre durante um período de três semanas em níveis de umidade de mais de 20% e temperatura entre 20 °C e 25 °C (Santin et al., 2005). A grande variação térmica é essencial para produção de micotoxinas por fungos *Fusarium*, como comprovado por Martins & Martins (2002) em estudo *in vitro*. Os autores verificaram que a maior produção de ZEA ocorreu no milho incubado a 28°C por 15 dias e seguidos de queda na temperatura para 12°C. Esta condição é encontrada em regiões de clima temperado da América, Europa e Ásia (Creppy, 2002). No Brasil, estas condições são observadas principalmente nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A temperatura ótima para a produção de ZEA está entre 12-14°C. Além disso, as variações térmicas que ocorrem entre o dia e a noite também se tornam importantes à produção da zearalenona. Assim, a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes para o crescimento de

fungos, produção de toxinas e, conseqüentemente, contaminação de produtos por estas micotoxinas.

A ZEA pode ser produzida rapidamente durante o cultivo dos grãos ainda no campo, ao final do verão ou início do outono devido a variação de temperatura e umidade. Concentrações elevadas de ZEA podem ser encontradas nos grãos durante o armazenamento inadequado, principalmente devido ao alto teor de umidade. Amostras de milho armazenadas inadequadamente e expostas às condições de inverno tornam-se particularmente propensas à invasão de fungos e produção de ZEA. Além disso, a ZEA é comumente detectada em grãos com outra micotoxina derivada do gênero *Fusarium*, a desoxinivalenol. A ZEA é termicamente estável, mas pode ser parcialmente destruída durante a extrusão de cereais (Castells et al., 2005). A extrusão é um processo de produção mecânica de rações e cereais em que a alta temperatura aplicada à produção da farinha de milho, por exemplo, está correlacionada à destruição parcial de micotoxinas como a ZEA e a fumonisina (Santuário, 2003).

2.4.3 ZEA: Toxicocinética e Toxicodinâmica

A ZEA é absorvida rapidamente após administração oral (Avantaggiato, et al., 2003), sendo que em suínos, a absorção após uma dose de 10 mg/kg de peso vivo é de aproximadamente de 80 a 85 % (Biehl et al., 1993). Após a administração da ZEA, ela se distribui para os órgãos reprodutores (ovário e útero), tecido adiposo, tecido intersticial e células dos testículos (Kuiper-Goodman et al., 1987). A absorção de ZEA segue uma cinética de primeira ordem, com K_a (constante cinética) igual a 9,3/horas em ratos (Ramos et al., 1996).

Durante a metabolização em mamíferos, ocorre a formação de dois metabólitos isômeros da ZEA, α - e β - zearalenol (Figura 3) que, da mesma forma que a ZEA, possuem ação estrogênica. Estes metabólitos também são produzidos pelos fungos, porém em uma concentração inferior à produzida durante a metabolização da ZEA no organismo animal (Zinedine, 2007).

O conhecimento dos mecanismos de biotransformação tem fundamental importância para o entendimento dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxinas. As espécies animais apresentam diferentes sistemas enzimáticos que convertem as substâncias tóxicas em hidrofílicas para serem excretadas do organismo. Em alguns casos os produtos da metabolização têm toxicidade mais acentuada que o próprio substrato, como é o caso da ZEA

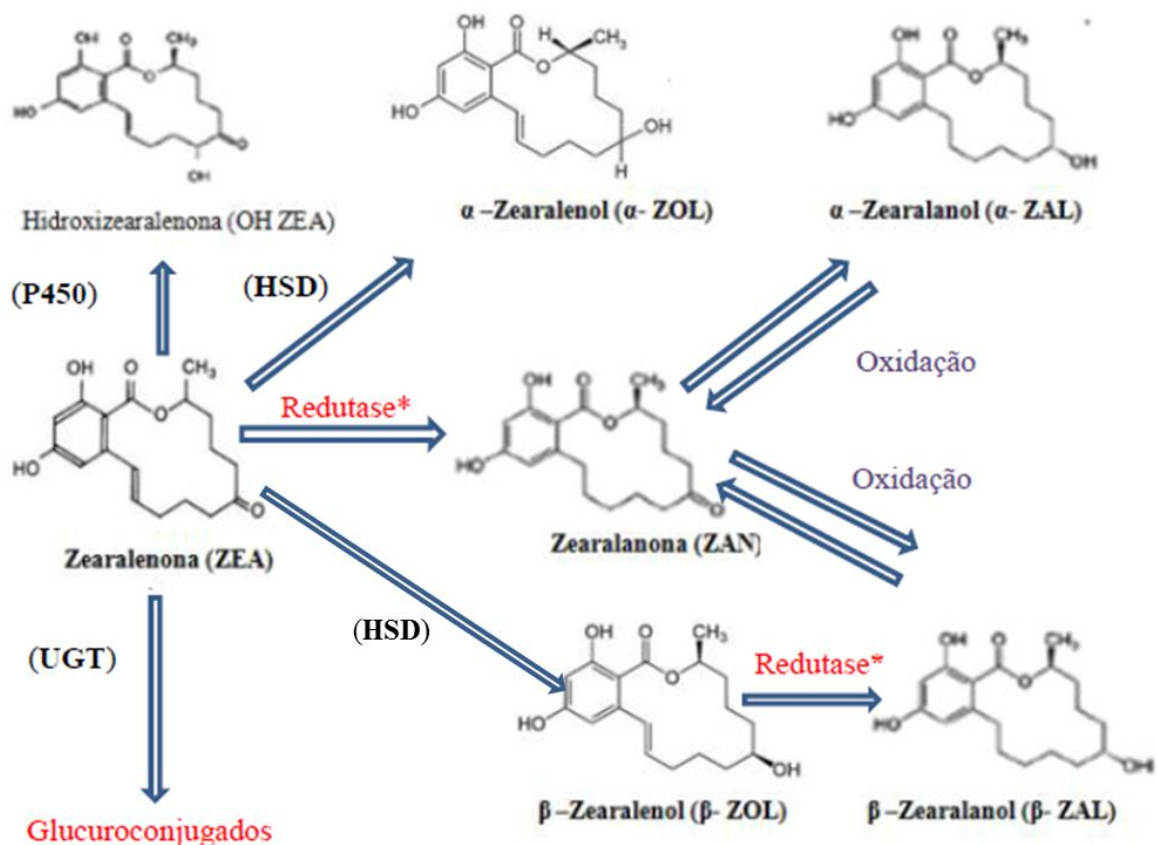
(Malekinejad et al., 2006). Assim, diferentes espécies animais reagem de modo diferente aos efeitos tóxicos da ZEA, o que pode estar relacionado com a biotransformação hepática desta micotoxina. Células microssomais hepáticas de suínos produzem maior quantidade de α -zearalenol, que possui maior atividade estrogênica em comparação com β -zearalenol, enquanto microssomas de frango produzem a maior quantidade de β -zearalenol, que tem menor atividade estrogênica (Malekinejad et al., 2006).

A biotransformação da ZEA é representada esquematicamente na figura 3. Seu metabolismo pode ocorrer por duas vias, a via 1, por hidroxilação; e a via 2, por conjugação ao ácido glicurônico (Olsen et al., 1981) que inativa a ZEA e seus metabólitos. A via 1 consiste na formação de α - e β -zearalenol (α - e β -ZOL) e ZEA (ZEA), catalisada pelas enzimas 3α - e 3β -hidroxisteróide desidrogenase (HSD). Na via 2 a conjugação da ZEA e de seus metabólitos com ácido glicurônico é catalisada pela glucuronil-difosfato-uridina-transferase1 (UDFGT) (Olsen et al., 1981). As enzimas 3α - e 3β -HSDs estão presentes em vários órgãos e são responsáveis pelo metabolismo dos hormônios esteróides (Fink-gremmels & Malekinejad, 2007). O mecanismo de ação das 3α e 3β HSDs na biotransformação da ZEA não é totalmente conhecido em animais. Em humanos essas enzimas atuam na presença de dinucleotídeo de nicotinamida adenina reduzido (NADH) e exercem uma função importante na regulação dos hormônios esteróides em nível de receptores (Thomas et al., 2004). Em exposição prolongada no organismo, a ZEA compete com os hormônios esteróides por servir de substrato às enzimas 3α e 3β hidroxisteróide desidrogenases. Além disso, em suínos e, provavelmente, em seres humanos, a ZEA é rapidamente absorvida após a administração oral e pode ser metabolizada nas células intestinais. Nessas células, a ZEA é degradada em α - e β -zearalenol (α - e β -ZOL) e α - e β -zearalanol (α - e β -ZAL), que são posteriormente conjugados com ácido glicurônico (JECFA, 2000). O principal órgão responsável pela redução da micotoxina em α -zearalenol e β -zearalenol é o fígado, e esta rota foi demonstrada por muitos autores em várias espécies, como nos ratos, suínos, perus e galinhas.

O metabólito α -zearalenol possui maior potencial estrogênico que a ZEA e o β -zearalenol (Malekinejad et al., 2006), uma vez que possui maior afinidade pela ligação com os receptores de estrogênio (Fink-gremmels & Malekinejad, 2007). Assim, a hidroxilação da zearalenona para α -zearalenol aparentemente é um processo de ativação, enquanto que a produção de β -zearalenol seria um processo de desativação. Em suínos há predominância da conversão da ZEA em α -zearalenol devido à eficiência da enzima 3α -HSD. Outra particularidade dos suínos é que, comparados às outras espécies animais, possuem menor capacidade de glicuronidação e, portanto, menor capacidade de inativação da ZEA e de seus

metabólitos (Fink-gremmels & Malekinejad, 2007). Somadas estas características e particularidades da metabolização da ZEA explica-se o fato desta espécie ser a mais sensível aos efeitos de ordem reprodutiva desta micotoxina.

Além disso, os suínos estão diretamente expostos à ZEA por terem sua base alimentar constituída de milho, sendo especialmente mais sensíveis aos seus efeitos tóxicos comparando-os as outras espécies animais (Malekinejad et al., 2006).



* Enzimas da flora intestinal

Figura 3: Representação dos metabólitos e principais enzimas envolvidas na biotransformação da ZEA.

A principal via de excreção para a maioria das espécies é através das fezes, embora coelhos excretem principalmente ZEA na urina. Nos suínos, aproximadamente 45% dos metabólitos são excretados na bile e somente 7% nas fezes (Biehl et al., 1993). Essa menor excreção nas fezes se deve a reabsorção dos metabólitos excretados pela bile. Assim, a maior rota de excreção da ZEA em suínos é através da bile e da urina (45%), como ilustra a figura 4.

Além disso, a maior parte da ZEA administrada é excretada dentro de um período de 72 horas para a grande maioria das espécies animais.

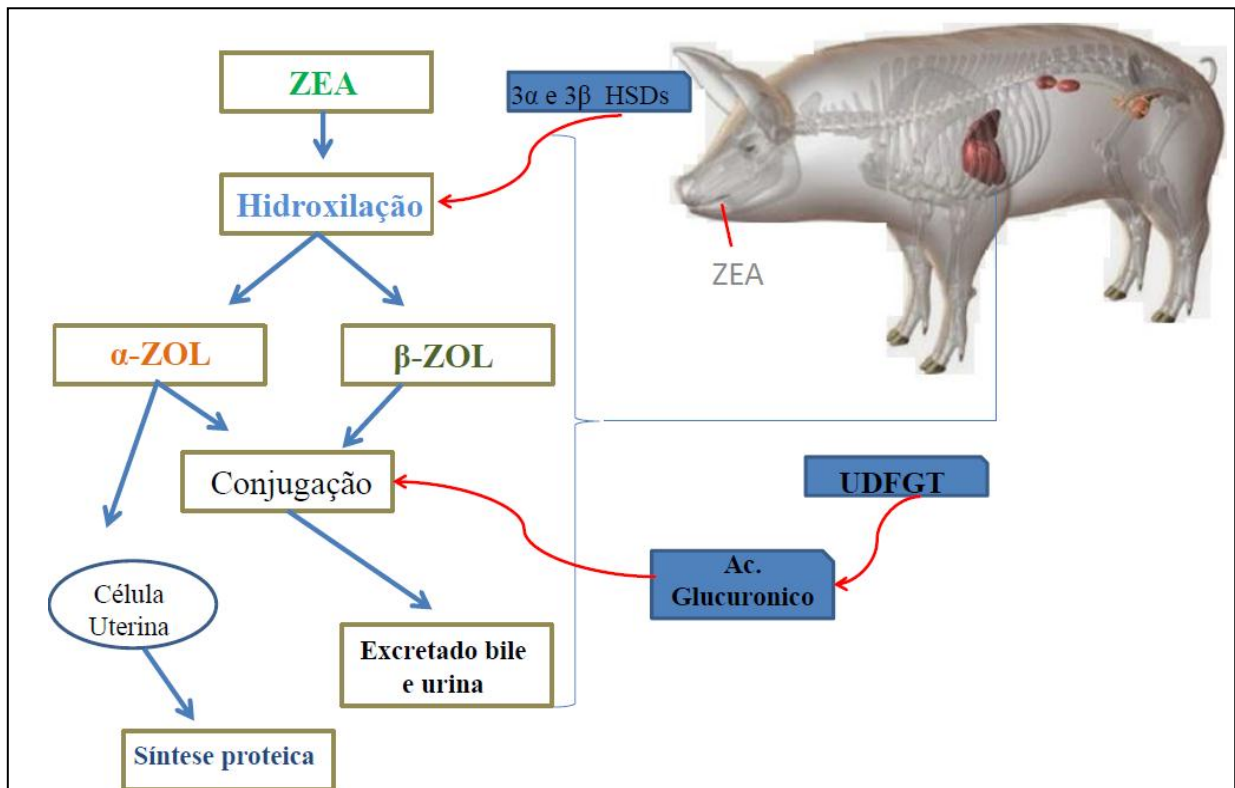


Figura 4: Representação esquemática da metabolização e excreção da ZEA em suínos.

Fonte: Hauschild et al., 2006, adaptado.

O sistema reprodutivo é um dos principais alvos de toxicidade da ZEA (Minervini & Dell'Aquila, 2008). A ação da ZEA ocorre por estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, aumentando a síntese protéica no aparelho reprodutor. Conseqüentemente, ela estimula a secreção das células endometriais, a síntese de proteínas uterinas e resulta em aumento do peso do trato reprodutivo (Gaumy et al., 2001). Especificamente, a ZEA e seus metabólitos podem interagir diretamente com os sítios de ligação dos receptores citoplasmáticos do hormônio 17β-estradiol e translocar o sítio de ligação destes receptores para o núcleo celular (Takemura et al., 2007). No núcleo, a estimulação do RNA leva a síntese de proteínas e sinais clínicos do estrogenismo. A toxicidade da ZEA tem sido associada com diminuição da fertilidade, redução da ninhada, alteração do peso da adrenal, tireóide e hipófise na prole, além de alteração nos níveis séricos de progesterona e estradiol (Minervini & dell'Aquila, 2008). A ZEA se liga aos receptores estrogênicos (Takemura et al., 2007), resultando em hiperestrogenicidade em várias espécies de animais, especialmente em suínos (Minervini & dell'Aquila, 2008) provocando aumento e/ou tumefação da vulva. A

intoxicação causa transtornos reprodutivos, como o aumento da infertilidade associada ao estro permanente, atraso no retorno ao estro, persistência de corpo lúteo, falhas na implantação, pseudogestação, anomalias ovarianas, nascimento de leitões fracos (Fink-gremmels & Malekinejad, 2007).

Os estrôgenos estão presentes tanto no sistema reprodutor feminino, como no masculino (Rago et al, 2006), e portanto estão envolvidos na estimulação da espermatogênese e síntese de esteróides através da ligação aos receptores de estrôgeno (ERs) (Stabile et al, 2006). Desse modo, em machos expostos à ZEA, pode ocorrer redução de testosterona sérica, da espermatogênese e do peso dos testículos, além da indução de feminização e redução de libido (Rago et al, 2006). Em camundongos tratados com ZEA nas doses de 25, 50 e 75 mg/Kg por 7 dias via intraperitoneal houve aumento da vesícula seminal e do peso da glândula preucial do testículo. Além disso, foi observado uma maior porcentagem de espermatozoides anormais, redução de espermatozoides vivos e de sua integridade acrossômica, redução na produção espermática e das células espermatogênicas, além da redução da concentração sérica de testosterona. Fêmeas que copularam com estes camundongos apresentaram uma taxa de concepção menor (Yang et al., 2007).

A ZEA afeta principalmente o sistema reprodutivo, no entanto, ela pode produzir efeitos adicionais. Durante a realização de ensaios *in vitro* com linhagens de células, a ZEA agiu como um ligante específico a determinados receptores ativando a transcrição de um fator de regulação da expressão de inúmeras enzimas metabolizadoras hepáticas, incluindo a expressão de enzimas do citocromo P450 (Yang et al., 2007).

O quadro clínico das intoxicações pela ZEA varia muito de acordo com quantidade de toxina ingerida, tempo de ingestão e idade, sexo e espécie animal. As micotoxinas em geral, entre elas a ZEA, provocam alterações dos parâmetros hematológicos, além de também possuírem ações hepatotóxicas, imunotóxicas e nefrotóxicas em animais e humanos (Hassen et al, 2007). Têm sido demonstrado que a ZEA e seus metabólitos possuem efeitos deletérios sobre as funções imunológicas nos seres humanos (Salah-Abbès et al. 2009), em bovinos (Lioi et al, 2004), frangos (Borutova et al, 2008), ratos (Doric et al, 2007) e camundongos (Pestka et al., 1987). Salah-Abbès et al. (2010) mostrou que a administração de 40 e 80 mg/Kg de ZEA em camundongos Balb/C durante 28 dias provocou redução do peso relativo dos órgãos do sistema imunológico e diminuição do número de linfócitos resultando em atrofia do baço e alteração na produção de citocinas e anticorpos. A ação hematotóxica da ZEA foi demonstrada nos estudos de Abbès et al. (2006), em que camundongos Balb/C e ratos, intoxicados com concentrações superiores a 10 mg/kg de ZEA, observaram disfunção

da coagulação, alterações de alguns parâmetros hematológicos como aumento do número das hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e redução do número de plaquetas. Houve ainda redução do número de linfócitos (Abbès et al., 2006) reforçando a capacidade imunossupressora desta micotoxina.

O estresse oxidativo, como um elemento indutor do desequilíbrio da homeostase dos organismos vivos, também possui relação com a toxicodinâmica das micotoxinas. Nesse sentido, o estudo de enzimas pró-oxidantes e compostos antioxidantes tornam-se vitais para um melhor entendimento sobre os efeitos tóxicos da ZEA já que vários estudos sugerem que o estresse oxidativo parece ser um determinante chave da toxicidade induzida pela ZEA *in vivo* e *in vitro* (Hassen et al., 2007).

2.4.5 Modo de ação e sinais clínicos em animais

A ação da ZEA ocorre por estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, incrementando a síntese protéica no aparelho reprodutor. Conseqüentemente, estimula a secreção das células endometriais, síntese de proteínas uterinas e resulta em aumento do peso do trato reprodutivo (Yang et al., 2007). Entretanto, a intensidade de seus efeitos tóxicos depende do status reprodutivo do animal, ou seja, se está em fase pré- púbere, em cio ou gestante (Salah-Abbès et al. 2010).

Em machos expostos a ZEA pode ocorrer depressão sérica de testosterona, da espermatogênese e do peso dos testículos, além da indução de feminização e redução de libido (Salah-Abbès et al. 2010). Em camundongos inoculados por via intraperitoneal houve aumento da vesícula seminal, do peso da glândula prepucial do testículo e de espermatozoides anormais, redução de espermatozoides vivos, de sua integridade acrossômica, na produção espermiática, das células espermatogênicas e da concentração sérica de testosterona. Fêmeas que copularam com estes camundongos tiveram menor taxa de concepção (Yang et al., 2007).

2.5 Flavonoides

Flavonoides (Figura 5) são substâncias pertencentes a uma classe de produtos naturais que atualmente podem ser consideradas micronutrientes. Estão presentes na dieta humana rica em vegetais e frutas, que são as principais fontes dessas substâncias (Benavente-García et al., 1999).

O preparo dos alimentos para consumo pode, algumas vezes, resultar em perdas destes compostos, em maior ou menor grau, variando de acordo com o tipo de alimento e o tipo de preparo empregado. Todavia, os flavonoides são compostos relativamente estáveis, pois resistem à oxidação, altas temperaturas e moderadas variações de acidez (Peterson & Dwyer, 1998).

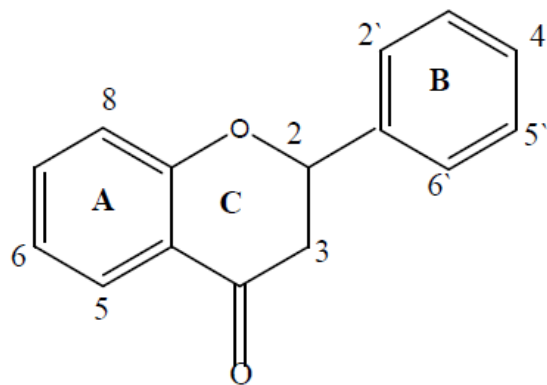


Figura 5: Estrutura básica dos flavonoides

Algumas dietas como a mediterrânea, rica em frutas frescas e vegetais, têm sido associadas com a baixa incidência de doenças, como as doenças cardiovasculares e o câncer, principalmente devido à elevada proporção de compostos bioativos como vitaminas, flavonoides e polifenóis (Benavente-García et al., 1999). Tais compostos possuem uma série de propriedades farmacológicas que os fazem atuarem sobre os sistemas biológicos (Lopes et al., 2003).

Já foram descobertos mais de 6.000 flavonoides divididos em 6 principais classes, (Benavente-García et al., 1999). Os flavonoides compõem uma ampla classe de substâncias de origem natural, cuja síntese não ocorre na espécie humana, por exemplo, os antioxidantes. Os flavonoides são derivados da reação de condensação do ácido cinâmico com grupos malonil-

CoA e a sua classificação depende do nível de oxidação verificado em suas estruturas químicas (Lopes et al., 2003).

A estrutura química dos flavonoides está baseada no núcleo flavilium, o qual consiste de três anéis fenólicos. O benzeno do primeiro anel é condensado com o sexto carbono do terceiro anel, que na posição 2 carrega um grupo fenila como substituinte. O terceiro anel pode ser um pirano heterocíclico, gerando as estruturas básicas das leucoantocianinas e das antocianidinas, denominado de núcleo flavana (Peterson & dwyer, 1998).

2.6 Crisina

A crisina (5,7-Dihidroxiavona, Fig.6) é encontrada principalmente na *Passiflora coerulea* (regionalmente conhecida como maracujá do mato), isolada em 1990 e apresentada como um composto com propriedades anticonvulsivantes (Ciftci et al., 2012). O flavonoide crisina é da classe das flavonas. Possui hidroxila livre nos carbonos 5 e 7 do anel e fluorescência na faixa do amarelo, também encontrada naturalmente em mel, própolis, e várias espécies de plantas, incluindo espécies do gênero *Pelargonium*, *Passiflora* e da família *Pinaceae* (Ciftci et al., 2010).

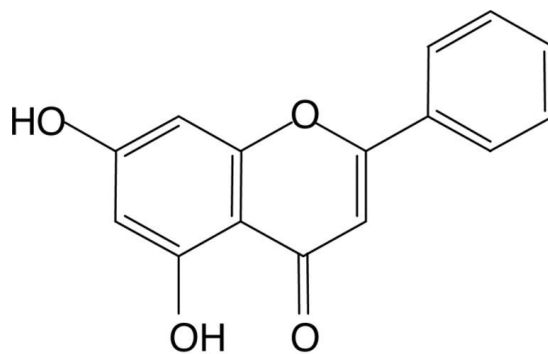


Figura 6: Estrutura básica da crisina

Fonte: Zhang et al., 2005

2.6.1 Propriedades bioativas da crisina

A crisina é um flavonoide antioxidante com propriedades complexantes, devido principalmente à presença de um grupo hidroxila no carbono 5 (Pushpavalli e al., 2010). Estudos sobre a atividade antioxidante de flavonoides sugerem a relação da presença de hidroxilas na bioatividade destes compostos (Pushpavalli e al., 2010). Mais especificamente, a

capacidade antioxidante de um flavonoide geralmente está relacionada principalmente com a hidroxilação do anel B. No entanto, as hidroxilas presentes nos carbonos 5 e 7 do anel A da crisina desempenham uma função significativa na atividade antioxidante deste composto (Ciftci et al., 2012).

Além da função antioxidante (Pushpavalli et al., 2010), a crisina já tem sido apresentada como, anti-inflamatórios (Ciftci et al., 2012), e anti-hiperlipidêmicos (Zarzecki et al., 2014). Tem sido relatado que a crisina aumenta a expressão do gene StAR ocorrendo um aumento concomitante da produção de testosterona (Jana et al., 2008). Também há relatos que sugerem que a crisina aumenta os níveis de testosterona pela inibição da enzima aromatase (Anand et al., 2012), que converte a testosterona em estradiol.

A administração da crisina reduz a expressão de proteínas pró inflamatórias. Indicando que a crisina regula os níveis destas proteínas pró-inflamatórias, juntamente com a regulação da interleucina 10 (IL-10) atenuando a disfunção testicular em ratos com artrite (Hebatallah et al., 2014).

A crisina também tem sido apontada como um potente inibidor de enzimas que participam do metabolismo de drogas, incluindo CYP1A1 e a fenol-sulfo-transferase (Ciftci et al., 2010), ambas envolvidas na bioativação da carcinogênese. O efeito vasorelaxante da crisina na aorta de ratos é endotélio e óxido nítrico dependente, e é mediado pela prevenção da inativação induzida por O₂ no endotélio, derivado de óxido nítrico e pela potencialização na indução da vasodilatação por GMP cíclico (Hebatallah et al., 2014).

Apesar de a crisina já ter sido explorado em diversas patologias, estudos avaliando possíveis efeitos protetores em modelos patológicos causados por micotoxinas ainda não foram relatados.

2.6.2 Biodistribuição, metabolismo e eliminação da crisina

A característica fundamental dos flavonoides quanto à farmacocinética ou toxicocinética são os grupos hidroxila livres, que são rapidamente e eficientemente metabolizados via glucuronidação e sulfatação (Bokkenheuser et al., 1987). Os flavonoides, em geral, apresentam-se em duas formas, a forma glicosilada (conjugados com açúcares) e a forma agliconada (livre). De um modo geral, assume-se que os flavonoides glicosilados são absorvidos na forma agliconada após passar por hidrólise no trato digestivo. Na forma agliconada, nos enterócitos, as principais transformações que ocorrem com os flavonoides incluem reações de glucuronidação e sulfatação, que podem ser seguidas de efluxo,

culminando na eliminação via fezes, urina e dióxido de carbono (mediada por bactérias do trato intestinal), ou absorção e distribuição para os tecidos via sistema circulatório (Walle, 2004).

A crisina é um flavonoide agliconado que, como a maioria dos flavonoides, é considerada um composto de relativamente baixa taxa de absorção oral (Walle, 2004). Tsuji et al. (2006) avaliaram o acúmulo da crisina em peixes após 8h de exposição, verificando, em ordem decrescente, maiores concentrações em fígado, intestino, pele e cérebro. Quanto ao metabolismo, o mesmo grupo de pesquisadores observou que a crisina sofre glucuronidação após a absorção, presumivelmente nos carbonos 5 e 7 e é secretada na bile. Walle et al. (2001) monitoraram os níveis de crisina e dos metabólitos crisina sulfatada e crisina glucuronada em sangue, urina e fezes de humanos saudáveis durante 48h após a administração de 400 mg de crisina pela via oral. Nas análises sanguíneas, foram verificadas baixas concentrações de crisina livre, com picos de em média 6 ng/ml após 6 horas. Já para a crisina conjugada com sulfato, o pico foi de 200 ng/ml (cerca de 30 vezes maior em relação à crisina livre) e se deu aproximadamente 6h após a ingestão. Para a crisina glucuronada, não foram encontrados níveis plasmáticos suficientes para uma detecção precisa. No que se refere à eliminação via urina, Walle et al. (2001) demonstraram que a excreção de crisina livre na urina se deu entre 0,2 e 3,1mg. Já para a crisina glucuronada foram encontradas concentrações entre 2 e 26 mg na urina. Para a crisina sulfatada foram verificados apenas traços não detectáveis de forma precisa. Ainda, observou-se que a taxa de eliminação de crisina e seus metabólitos via urina é baixa, entre 1 e 7%. Quanto à eliminação via fezes, verificou-se que a taxa de eliminação de crisina e metabólitos chegou até 98% da crisina administrada, com valores que variaram entre 40 e 390 mg. A partir disso, com base nas análises plasmáticas, observa-se que as possíveis formas nas quais a crisina exerce a sua constatada bioatividade seriam a forma livre e, talvez principalmente, a forma sulfatada. Já a forma glucuronada é a forma predominante de eliminação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito protetor da crisina frente aos efeitos tóxicos da micotoxina ZEA nos testículos e no sangue de camundongos swiss.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar a toxicidade da ZEA e um possível efeito protetor da crisina no sistema reprodutor através da realização da contagem e motilidade espermática;
- Determinar os níveis plasmáticos de testosterona;
- Determinar a toxicidade da ZEA e um possível efeito protetor da crisina nos parâmetros inflamatórios: (IL-1 β , IL-6 e IL-10, TNF- α e a enzima MPO);
- Determinar a toxicidade da ZEA e um possível efeito protetor da crisina nos parâmetros enzimáticos e não-enzimáticos do estresse oxidativo; Os marcadores enzimáticos catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) e os marcadores não enzimáticos glutathione reduzida (GSH), TRAP (capacidade de reatividade antioxidante total) e TAR (capacidade antioxidante total) e 4-Hydroxynonenal (4-HNE);
- Determinar uma possível ação apoptótica da ZEA e um possível efeito protetor da crisina utilizando os marcadores apoptóticos Caspases 3 e 6 além de quantificar os níveis de 8-hydroxy-2'-deoxyguanosina (8-OHdG);

5. MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito. Os itens Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo. O manuscrito está disposto da mesma forma que foi submetido para a Revista “Food and Chemical Toxicology”.

**The flavonoid chrysin protects against zearalenone induced reproductive toxicity in
male mice**

Lucian Del'Fabbro, Cristiano Ricardo Jesse, Marcelo Gomes de Gomes, Carlos Borges Filho,
Franciele Donato, Leandro Cattelan Souza, André Rossito Goes, Silvana P. Boeira

Laboratório de avaliações farmacológicas e toxicológicas aplicadas às moléculas bioativas
(Laftambio Pampa), Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, 97650-000 Itaqui, RS,
Brasil

*Correspondence should be sent to:

Cristiano R. Jesse E-mail: cristianoricardojesse@yahoo.com.br

Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas
– *LaftamBio* Pampa – Universidade Federal do Pampa, CEP 97650-000, Itaqui, RS, Brazil.

Phone: +55-55-34331669

FAX: +55-55-3433166

Abstract

The objective of this study was to investigate the protective potential of chrysin against zearalenone (ZEA) toxicity on number and motility of sperm, the oxidative damage, the inflammation and apoptosis in testicular tissue in mice. ZEA caused damage to the male reproductive system with decrease of the number and motility of sperm, the levels of plasmatic testosterone, depletion antioxidant defenses through the enzymatic activities (glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase) and total reactive antioxidant and total antioxidant capacities. It also observed the depletion of levels of reduced glutathione (GSH) and the GSH/oxidized glutathione and increase of 4-hydroxynonenal levels. In relation to inflammation, the increase of myeloperoxidase activity, levels of interleukins 1 β and 6 and tumor necrosis factor alpha and reduction of IL-10 levels in testicular tissue was observed after ZEA administration. The apoptotic process began with the increase of activity of caspases 3 and 9 and 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine levels. Chrysin treatment increased the number and motility of sperm and the levels of testosterone, restored antioxidant defenses and reduced the inflammation and apoptosis process. Chrysin attenuated the toxic effects caused by ZEA in blood and reproductive systems of mice. We suggest that chrysin become a preventative treatment against the deleterious effects of ZEA.

Key-words: Mycotoxins, glutathione, apoptosis, inflammation, spermatozoa.

1. Introduction

The concentrations of mycotoxins in food and feed vary over a wide range, depending on climatic conditions (Sun et al., 2014). Considering the mean levels of zearalenone (ZEA) in the principal foods and their consumption, the average human daily intakes of ZEA range from 2.4 to 29 ng/kg b.w./day in adults, while toddlers (12–36 months old) have the highest average daily intakes ranging from 9.3 to 100 ng/kg b.w./day (Köppen et al., 2012). ZEA is rapidly absorbed after oral administration. Its uptake is estimated to be approximately 80–85%, but it is difficult to measure owing to extensive biliary excretion. ZEA and its derivatives are detected in blood about 30 min after oral administration bound to human globulins as reproductive hormones (Wang et al., 2014).

ZEA belongs to a group of mycotoxins with strong estrogenic effects (Wang et al., 2010). Toxic effects of ZEA and its metabolites have been attributed primarily to its chemical structure that resembles that of naturally occurring estrogens (Pfeiffer et al., 2010), consequently, is responsible for a potent reproductive toxicity in humans and animals (Köppen et al., 2012). This mycotoxin binds to estrogenic receptors (ER) (Boeira et al., 2014) and may produce various estrogen-disrupting effects at relatively low concentrations, including infertility, reduced testosterone concentrations and sperm counts, enlargement of ovaries and uterus, decrease of incidence of pregnancy, and change in progesterone levels in animals (Zinedine et al., 2007).

Several studies suggest that ZEA caused oxidative stress, alternated levels of key enzymes for the maintenance of normal cell state: reduced glutathione (GSH) dependent antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST), which collectively maintain an optimal redox state in the cells (Boeira et al., 2012; 2014). It was also reported that ZEA induced apoptosis and inflammation. ZEA was described to be both suppressor and inductor of inflammation (Marin

et al., 2012). Marin et al. (2013) indicated a different action of ZEA on the inflammatory interleukins synthesis in liver and spleen. In another study, the action of ZEA included upregulation of Bax expression, cytochrome c release into the cytosol and triggered mitochondria-mediated apoptosis (Wang et al., 2014).

In this context, chrysin (5,7-dihydroxyflavone) is a natural flavonoid which is contained in many plant extracts, flowers such as the blue passion flower (*Passiflora caerulea*), honey and propolis (Ciftci et al., 2012), beyond is the major component of some traditional medicinal herbs (Pushpavalli et al., 2010). Chrysin has the broad range of pharmacological activities, such as anticancer, antioxidant and anti-inflammatory (Ciftci et al., 2010). However, the effect mechanism of chrysin is not well known, it is thought that these beneficial effects of chrysin may be due to its free-radical-scavenging capability (Anand et al., 2012). Chrysin displayed beneficial actions on male reproductive system in normal adult rats (Ciftci et al., 2012) and halted the decline of testosterone in aging rats (Anand et al., 2012).

In the current study, we aimed to investigate the protective potential of chrysin against ZEA toxicity on number and motility of sperm, the assessment of plasmatic testosterone levels, interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-10) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the parameters of oxidative damage (levels of GSH, oxidized glutathione (GSSG), total reactive antioxidant capacity (TRAP) and total antioxidant capacity (TAR), 4-hydroxynonenal (4-HNE) and activities of GPx, GR, GST, catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD)), inflammation (myeloperoxidase (MPO)), and its possible action in apoptosis (caspase 3 and 9 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)) in the testicular tissue in adult male mice.

2. Materials and methods

2.1 Animals and Reagents

Sixty male Swiss mice (25–30 g in weight and adults) purchased from Federal University of Santa Maria. Animals were housed, divided in groups of 6 in Plexiglas cages (41 cm × 34 cm × 16 cm) with the floor covered with sawdust. They were kept in a room with light-dark cycle of 12 h with the lights on between 7:00 and 19:00 h and temperature controlled (20–25 °C) and received water and food *ad libitum*. The animals were maintained and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (process #020/2014) of the Federal University of Pampa, Brazil.

ZEA, chrysin and other reagents used in this experiment were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) with the exception of the reagents used for quantification of cytokines that were acquired from BIO-RAD and 4-HNE and 8-OHdG purchased by Cell Bio labs, SanDiego,USA.

2.2 Treatment

Mice were weighed and randomly divided in six groups which received chrysin (5 and 20 mg/kg) or saline by oral route (*per oral*, p.o.) (10 ml/kg) for ten days. In the eleventh day mice received ZEA (40 mg/kg). 48 hours after ZEA or vehicle, euthanasia was conducted with an administration of pentobarbital (180 mg/kg intraperitoneal, i.p.). Blood was collected by cardiac puncture into tubes containing heparin (1 UI/μl) for the quantification of testosterone. The testis was removed, weighed and homogenized in Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 for the determination the enzymatic indicators of oxidative stress, inflammation and

apoptosis. The epididymis were weighed and used for determining the number and motility of spermatozoa. The experimental design is shown in Figure 1.

2.3 Number and motility of spermatozoa

Assessment of spermatozoa count and motility was performed according to (Freund and Carol, 1964). The two cauda epididymides from each mouse were homogenized in 2 mL of warmed (37°C) saline solution (0.9% NaCl). Briefly, 10 μ L of the diluted spermatozoa suspension was transferred to each counting chamber of the hemocytometer and was allowed to stand for 5 min. The cells settled during this time were counted with the help of light microscope at 200 x magnification (Nikon Eclipse 50i).

2.4 Plasma Testosterone levels

Serum testosterone level was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-rat ELISA commercial kits from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The radioactivity was measured by automatic counter for determining the standard curve and the concentration of the samples. Results were expressed as ng/ml serum.

2.5 Glutathione Peroxidase (GPx) activity

GPx activity was assayed spectrophotometrically according to the method of Wendel, (1981). Through the glutathione/NADPH/GR system, by the dismutation of H_2O_2 at 340 nm. In this assay, the enzyme activity is measured indirectly by means of NADPH decay. H_2O_2 is decomposed, generating GSSG from GSH. GSSG is regenerated back to GSH by the GR present in the assay media, at the expense of NADPH. The enzymatic activity was expressed in $nmol\ NADPH\ min^{-1}\ mg^{-1}\ protein$.

2.6 Glutathione Redutase (GR) activity

GR activity was determined as described by Carlberg and Mannervik, (1975). In this assay, GSSG is reduced by GR at the expense of NADPH consumption, which is followed at 340 nm. GR activity is proportional to NADPH decay. An aliquot of S1 was added in the system containing 0.15 M potassium phosphate buffer (pH 7.0), 1.5 mM EDTA, and 0.15 Mm NADPH. After the basal reading, the substrate (GSSG 20 mM) was added. The enzymatic activity was expressed as $\text{nmol NADPH min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$.

2.7 Glutathione-S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of Habig et al., (1974) . The reaction mixture contained a 50 μl aliquot from supernatant (1000 x g/10min/4°C) of testes, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM CDNB. GST activity was expressed as nmol CDNB/min/mg of protein.

2.8 Catalase (CAT) activity

CAT activity was determined by following the decomposition of 30 mM hydrogen peroxide in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) at 240 nm for 120 s in a thermostated (37°C) spectrophotometer, according to the method proposed by Aebi, (1984). CAT specific activity was expressed as first-order rate constant k corrected per mg of protein.

2.9 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity in testis homogenate was assayed spectrophotometrically as described by Misra and Fridovich, (1972). The colour reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50%.

2.10 Fluorimetric Assay of Reduced (GSH) and Oxidized (GSSG) glutathione

For the measurement of GSH and GSSG levels, we used a method previously described by Hissin and Hilf, (1976). Briefly, 100 mg of testes were homogenized in 3.75 ml phosphate– EDTA buffer (pH 8) plus 1 ml HPO_3 (25%). Homogenates were centrifuged at 4 °C at 100,000 x g for 30 min, and the supernatants (S2) were separated in two different aliquots of 500 ml each for measurement of GSH and GSSG. For GSH measurement, 500 ml of the supernatant (S2) was diluted in 4.5 ml of phosphate–EDTA buffer (pH 8) (sodium phosphate 100 mM and EDTA 5 mM). The final assay mixture (2.0 ml) contained 100 ml of the diluted tissue supernatant, 1.800 ml of phosphate–EDTA buffer and 100 ml of O-Phthalaldehyde (OPA) (1 mg/ml). The mixtures were incubated at room temperature for 15 min and their fluorescent signals were recorded in the Agilent spectrofluorometer at 420 nm of emission and 350 nm of excitation wavelengths. For measurement of GSSG levels, a 250 μL of the supernatant (S2) was incubated at room temperature with 100 μL of N-ethylmaleimide (NEM) (0.04 M) for 30 min at room temperature, and after that, 140 μL of the mixture, were added to 1.760 μL of NaOH (0.1 N) buffer, following of added 100 μL OPT and incubated for 15 min, using the procedure outlined above for GSH assay. The results are expressed in $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein.

2.11 Total reactive antioxidant capacity (TRAP) and total antioxidant capacity (TAR)

TRAP and TAR of the testis was estimated by the Lissi et al., (1995). The reaction is initiated by adding luminol (5-Amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione, 4 mM), an external probe for monitoring radical production, as well as AAPH (2,2'-Azobis-2-methylpropionamide-dihydrochloride, 10 mM), a free radical source that produces peroxy radical at a constant rate, in glycine buffer (0.1 M) pH 8.6 at room temperature, resulting in a steady luminescence emission (system counts). Chemiluminescence was read in a liquid scintillation counter (Agilent Care Elipse) as counts per minute. The sample addition decreases the luminescence proportionately to its antioxidant potential. The luminescence emission was followed for 40 min after the addition of the sample (100 g of protein) in a TRAP protocol, and the area under the curve (AUC) was quantified. In the TAR protocol, results were expressed as the percentage of radical production (e.g., system counts considered to be 100% of radical production).

2.12 Cytokines assay

Quantization of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in testicular tissue was performed using a Bio-Plex Rat, (Bio-Rad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Results are shown as pg/mg tissue.

2.13 Myeloperoxidase (MPO) activity

MPO activity, an index of polymorph nuclear leukocyte accumulation, was determined by modification the method described by Mullane et al. (1985). The absorbance was measured by spectrophotometry at 630 nm and the data expressed as control percentage.

2.14 Caspase (3 and 9) activity assay

Caspase 3 and 9 activity was measured by using fluorimetric assay kit (fluorimetric caspase 3 and 9 assay kit) from Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA at excitation and emission wavelengths 360 nm and 460 nm, respectively. The data expressed as control percentage.

2.15 Measurement of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

The contents of 4-HNE and 8-OHdG were measured in testis in ELISA kits according to the manufacturers' instructions (Cell Bio labs, San Diego, USA). The results were expressed in $\mu\text{g/ml}$ (4-HNE) and ng/ml (8-OHdG).

2.16 Protein determination

Protein content was measured colorimetrically by the method of (Bradford, 1976), and bovine serum albumin (1 mg/ml) was used as standard.

2.17 Statistical Analysis

Graphpad prism 5 software was used for statistical analysis and for plotting graphs. Data were analyzed by a two way ANOVA and post hoc analyses were carried out by the Newman-Keuls. A probability of $P < 0.05$ was considered significant, and all data are reported as mean and S.E.M.

3 Results

3.1 Number and motility of spermatozoa

Figure 2 demonstrated the effects of ZEA and chrysin on reproductive parameters in male mice. Acute exposition to ZEA significantly reduced the number (Fig. 2A) and motility of living spermatozoa (Fig. 2B). Chrysin at doses of 5 and 20 mg/kg was able to revert the deleterious effects of ZEA on sperm count and motility.

3.2 Plasma Testosterone levels

The effect of chrysin on plasma levels of testosterone in ZEA-treated mice are presented in Figure 3. The plasma levels of testosterone in the ZEA-treated mice decreased significantly when compared to the control group. Administration of chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) to ZEA-treated mice resulted in significant increases in the levels of testosterone compared with ZEA group.

3.3 Antioxidant enzyme (GPx, GR, GST, CAT and SOD) activities

In order to evaluate the role of oxidative stress on the effects induced by acute administration of ZEA and the protective effect of chrysin, we measured enzymatic markers of oxidative stress in testis. Statistical analyses revealed that ZEA inhibited GST, GPx and GR activities in testis and treatment with chrysin was able to reverse this inhibition to the parameters (Table. 1). However, neither ZEA nor chrysin changed CAT and SOD activities in testis (Table. 1).

3.4 Non-enzymatic antioxidants levels (GSH, GSSG, ratio GSH/GSSG, TRAP and TAR)

Table 2 illustrates that the administration of ZEA markedly decreased the GSH, TRAP and TAR levels relative to that in the control group and also the ratio GSH/GSSG. Treatment with chrysin prevented the ZEA-induced depletion of GSH, TRAP and TAR and ratio GSH/GSSG levels when compared with the control group, indicating an improvement in the antioxidant defense system. In addition, the group treated with ZEA showed a significant increase in GSSG levels when compared with the control group, and chrysin effectively prevented besides promoting a decrease *per se*.

3.5 Cytokines quantization (IL-1 β , 6, 10, TNF- α) and MPO activity

ZEA administration significantly elevated levels of IL-1 β (FIG. 4A), IL-6 (FIG. 4B) TNF- α (FIG. 4D), and MPO activity (FIG. 4E) and reduces levels of IL-10 (FIG. 4C) in testicular tissue. Both groups treated with chrysin reduced the levels of IL-1 β (FIG. 4A), IL-6 (FIG. 4B), TNF- α (FIG. 4D), and MPO activity (FIG. 4E) and elevated the levels of IL-10 (FIG. 4C) in testis in mice treated with ZEA.

3.6 Caspase (3 and 9) activities

ZEA showed significant increase on caspase 3 and 9 activities in testis as compared to control group (FIG. 5A and 5B). Chrysin treatment (5 and 20 mg/kg, p.o.) significantly attenuated the activities of caspase 3 and 9 as compared to the control group (FIG. 5A and 5B).

3.7 Measurement of 4-HNE and 8-OHdG levels

As shown in FIG. 6A and 6B there was an increase in levels of 4-HNE and 8-OHdG in the testis of mice of the ZEA group. Treatment with chrysin (5 and 20 mg/kg) significantly reduced the levels of 4-HNE and 8-OHdG in testis in comparison of the ZEA group (FIG. 6A and 6B).

4 Discussion

The direct association between mycotoxins, inflammation, apoptosis and oxidative stress in the male reproductive system and the subsequent development of infertility constitute important issues in contemporary medicine. The integrity of the testicular tissue and the development of immunologic, apoptosis and oxidative mechanisms are essential for preservation of reproductive capacity. In the present study, we revealed that exposure of mice to ZEA resulted in a marked decrease in sperm count as well as motility with significant increases in the levels of interleukins (IL-1 β , IL-6 and TNF- α), accompanied with decrease in the serum testosterone levels and in the testicular GSH, TRAP and TAR content, a marked inhibition of GPx, GR and GST activities and increase in activity of caspase 3 and 9. In this context, we demonstrated the protective effect of chrysin on reproductive, oxidative, apoptotic and inflammatory alterations induced by the mycotoxin ZEA in mice.

In the present study, we showed that acute ZEA 40 mg/kg administration caused damage to the male reproductive system as drastically reduced the number and motility of live spermatozoa besides a reduction in testosterone levels (Boeira et al., 2014; Zinedine et al., 2007). The treatment by chrysin attenuated the reduction of the number and motility of live spermatozoa, particularly the dose of 20 mg/kg completely reversed the reproductive damage. The levels of testosterone were restored to control levels by chrysin at both doses, similarly at

Jana et al., (2008) and Ciftci et al., (2010). Spermatogenesis and testosterone biosynthesis are the major functions of mammalian reproductive system (Ciftci et al., 2010). This study demonstrated that chrysin protected the male reproductive system preventing the reduction of the number and motility of sperm beyond the maintenance of testosterone levels, probably through by modulating oxidative stress and reduction the process of apoptosis and inflammation in the testis of mice.

The antioxidant enzymes act cooperatively at different sites in the metabolic pathway of free radicals to prevent oxidative damage (Anand et al., 2012). GST activity is involved in this effect, because semen contains significant amounts of GST, which is important enzyme for sperm protection against oxidative stress (Jana et al., 2008). GSH may also serve as a cofactor for a several drug-metabolizing enzymes (GST) where it is consumed, or for antioxidant enzymes (GPX) where it functions as a redox partner (Venkataramana, 2014). During oxidation, GSH forms a dimer, glutathione disulfide (GSSG), which, in turn, can be reduced by the enzyme GR at the expense of NADPH (Mate et al., 2014). 4-HNE has been shown to be a key mediator in increasing neuronal vulnerability to oxidative insults (Mike et al., (2013). Based on these results, we reported that ZEA (40 mg/kg) reduced the activities of some key enzymes antioxidants (GST, GR and GPx) and altered the normal state of non-enzymatic antioxidant defenses increasing levels of GSSG and 4-HNE and decreasing the levels of GSH and the ratio GSH/GSSG, similar results were reported by Mate et al., (2014); Boeira et al., (2012), (2014); Mike et al., (2013). It was suggested that the depletion of antioxidants induced by ZEA could be also one of the reasons for increased oxidative stress in the testis and modifications of endocrine and reproductive parameters (Boeira et al., 2012, 2014). We demonstrated that the flavonoid chrysin (5 and 20 mg/kg) attenuated the state of oxidative stress and restored to normal levels the non-enzymatic parameters probably why be where as it has potent free radical scavenging properties, which are associated with the

hydroxyl substitution in the fifth and seventh positions that directly sequesters free radicals (Sathiavelu et al., 2009). The potential of chrysin to scavenge peroxy radicals by using TRAP/TAR indicated also a significant antioxidant capacity (Banerjee et al., 2005). Studies on the antioxidant potency of various flavonoids have confirmed the importance of the distribution and number of hydroxyl groups in the compounds. In general, the antioxidant properties of polyphenols depend on hydroxylation of ring B. In addition, meta-hydroxyl groups in ring A at positions 5 and 7 play a minor role in the antioxidant activity of chrysin (Torel et al., 1986). In this way, the beneficial effects of chrysin with improvement of antioxidant potential thereby normalized GSH and GSSG contents and GPx, GR and GST activities.

Inflammation is a physiological response aiming at defending the organism against injurious stimuli and initiating the healing process in order to restore tissue homeostasis (Milanino et al., 2006). Testicular macrophages secrete pro-inflammatory as well as anti-inflammatory cytokines (Hebatallah et al., 2014). The biological significance of these mediators for testicular function is unknown, but they appear to be involved in immunologic surveillance, immunoregulation, and tissue remodeling (Frungeri et al., 2002). Cytokines are important in host defense, inflammatory response, and immune-mediated disease. Through of this study, determined the cytokine concentrations, we quantified markers of the inflammation process (IL-1 β , 6, 10, TNF- α and MPO activity), ZEA initiated inflammation process as already reported by Choi et al., (2012) and Boeira et al., (2014); Marin et al., (2013). IL-1 β , IL-6 and TNF- α acted as pro-inflammatory cytokines while IL-10 is a master anti-inflammatory cytokine that encourages inflammatory resolution by blocking signals that initiate the synthesis of pro-inflammatory proteins (Milanino et al., 2006). High levels of MPO activity (as we demonstrate in the group treated with ZEA) is an indicator of severe inflammation (Kristin et al., 2013). Thus, MPO inhibition is a rational target for the treatment

of systemic inflammation. We showed that chrysin treatment decreased levels of IL-10 and restored levels of IL-1 β , 6, TNF- α and MPO activity. Chrysin is a natural product present in daily diet, exhibits a remarkable anti-inflammatory and immunoregulatory effects (Hougee et al., 2005). In this study, chrysin treatment protected testicular functions and spermatogenesis through increasing the levels of testosterone production, decreasing the levels of systemic proinflammatory cytokines and by modulation of antioxidant system and apoptosis process.

In this study, we also investigated the protective effect of chrysin against apoptosis caused by ZEA. Apoptosis is a way for the body to remove damaged or unnecessary cells (Wang et al., 2014). Caspase-3 is an executioner caspase that can be activated by caspase-9 in the mitochondrial pathway (Wang et al., (2014). Zatecka et al., (2014) reported apoptotic effects caused by ZEA. The extent and pathobiologic significance of oxidative DNA damage have been investigated in different tissues of rodents and 8-OHdG has been exploited as a product of oxidative DNA damage (Fleck et al., 2014). Caspase dependent apoptotic signaling and 8-OHdG plays a main role in ZEA induced apoptotic injury (Wang et al., 2014). In this study, ZEA treatment increased activities of caspase-3 and caspase-9 and levels of 8-OHdG and start the process of cell apoptosis, probably a consequence of high levels of inflammation and the state of oxidative stress that mycotoxin leads in the testis. Chrysin restored the normal activities of caspase-3 and caspase-9 and levels of 8-OHdG and this flavonoid probably reduced the apoptosis in the testicular tissue due the decreasing the inflammation and the oxidative stress.

5 Conclusions

In conclusion, in the present study we showed that ZEA treatment as caused damage to the male reproductive system in mice, the main damage was reduced the number and motility of spermatozoa, the levels of testosterone and it also caused oxidative damage and triggered a process of inflammation and apoptosis. Our results suggest that the chrysin treatment has protective effect against the damage caused by the action of ZEA, once restored testicular function, trough the restoration of defenses antioxidant and inflammatory parameters and it also prevented the apoptotic process. Based on these data we suggest that the flavonoid chrysin is likely to become a treatment for damage caused by ZEA in the male reproductive system.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Referências

- Aebi H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 6, 105-121.
- Anand, K.V., Jaabir, M.S.M., Thomas, P.A., et al., 2012. Protective role of chrysin against oxidative stress in D-galactose-induced aging in an experimental rat model. *Geriatr. Gerontol. Int.* 12, 741–750.
- Kristin, J. S., Stewart, S. C., Madeline, M. P., et al., 2014. Six weeks of voluntary wheel running modulates inflammatory protein (MCP-1, IL-6, and IL-10) and DAMP (Hsp72) responses to acute stress in white adipose tissue of lean rats. *Brain. Behavior. and Immunity* 39, 87–98.
- Banerjee, A., Dasgupta, N., De, B., 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem.* 90, 727–733.
- Boeira, S.P., Filho, C.B., Del’Fabbro, L., et al., 2012. Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. *Toxicol* 60, 358–366.
- Boeira, S.P., Filho, C.B., Del’Fabbro, L., et al., 2014. Lycopene treatment prevents oxidative stress, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone in Swiss mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 66, 179–185.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.

Carlberg I., Mannervik B., 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 250, 5475-5480.

Choi, B.K., Cho, J.H., Jeong, S.H., et al., 2012. Zearalenone Affects Immune-Related Parameters in Lymphoid Organs and Serum of Rats Vaccinated with Porcine Parvovirus Vaccine. *Toxicol.* 28, 279-288.

Ciftci, O., Ozdemir, I., Aydin, M., et al., 2012. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia* 44, 181–186.

Ciftci, O., Tanyildizi, S., Godekmerdan, A., et al., 2010. Protective effect of curcumin on immune system and body weight gain on rats intoxicated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Immunopharmacol. Immunoto.* 32, 99–104.

Fleck, S.C., Hildebrand, A.A., Müller, E., et al., 2012. Genotoxicity and inactivation of catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone. *Mycotoxin Res.* 28 (4), 267-73.

Freund, M., Carol, B. J., 1964. Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human semen. *Journal of Reproduction and Fertility* 42, 149-155.

Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Lustig, L., et al., 2002. Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertility and sterility* 78, 298-306.

Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

Hebatallah, A., Darwish, H., Araba, R.M., 2014. Chrysin alleviates testicular dysfunction in adjuvant arthritic rats via suppression of inflammation and apoptosis: Comparison with celecoxib. *Toxicology and Applied Pharmacology* 279, 129–140.

Hissin, P.J., Hilf, R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 74, 214–216.

Hougee, S., Sanders, A., Faber, J., et al., 2005. Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 69, 241–248.

Köppen, R., Riedel, J., Proske, M., et al., 2012. Photochemical trans-/cis-isomerization and quantitation of zearalenone in edible oils. *J. Agric. Food Chem.* 60 (47), 11733-40.

Jana, K., Yin, X., Schiffer, R.B., et al., 2008. Chrysin, a natural flavonoid enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression in mouse Leydig cells. *J. Endocrinol.* 197, 315–32.

Lissi, E., Salim-hanna, M., Pascual, C., et al., 1995. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminalenhanced chemiluminescence measurements. *Free Radical Biol. Med.* 18, 153–158.

Mate, G., Gazdag, A., Nora, Z., et al., 2014. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicon* 90, 155-166.

Marin, D.E., Taranu, I., 2012. Overview on aflatoxins and oxidative stress. *Toxin. Rev.* 31, 32-43.

Marin, D.E., Pistol, G.C., Neagoe, V.I.; et al., 2013. Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. *Food and Chemical Toxicology* 58, 408–415.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170–3175.

Mike, N., Papp, G., Certik, M., et al., 2013. Regulation of cytotoxic, non-estrogenic, oxidative stress-induced processes of zearalenone in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Toxicon* 73, 130–143.

Mullane, K.M., Kraemer, R., Smith, B., 1985. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J. Pharmacol. Methods* 14, 157-167.

Pfeiffer, E., Hildebrand, A.A., Becker, C., et al., 2010. Identification of an aliphatic epoxide and the corresponding dihydrodiol as novel congeners of zearalenone in cultures of *Fusarium graminearum*. *J Agric. Food. Chem.* 58 (22), 55-62.

Pushpavalli, G. C., Veeramani, K.V., Pugalendi V., 2010. Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against d-galactosamine-induced hepatotoxicity rats. *Food Chem. Toxicol.* 48, 1654–1659.

Sathiavelu, J., Senapathy, G.J., Devaraj, R., et al., 2009. Hepatoprotective effect of chrysin on pro oxidant antioxidants status during ethanol induced toxicity in female albino rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 809–817.

Stadnik, A., Wójtowicz-Chomicz, K., Borzecki, A., 2010. Influence of zearalenone on free radical reactions in rat liver cells. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 54, 611–615.

Timothy, P., Twaroski, M.L., Larry, W.O., 2001. Effects of selected polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on hepatic glutathione, glutathione-related enzymes, and selenium status: implications for oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* 62, 273–281.

Torel, J., Cillard, J., Cillard, P., 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochemistry* 25, 383–385.

Sun, X., Xingxing H., Xue, K.S., et al., 2014. Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10. *Food and Chemical Toxicology* 72, 76–82.

Venkataramana, M., Nayaka, S., Anand, T., et al., 2014. Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: The role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. *Food Chem. Toxicol.* 65 (3), 35-42.

Wang, Y., Zheng, W., Bian X., et al., 2014. Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in primary Leydig cells. *Toxicol. Lett.* 226 (2), 182-191.

Wang, N.Y., Zhang, Y.Z., Peng, D.S., et al., 2010. Qi Interaction of zearalenone and soybean isoflavone on the development of reproductive organs, reproductive hormones and estrogen receptor expression in prepubertal gilts. *Animal Reproduction Science* 122, 317–323.

Wang, H.W., Wang, J.Q., Zheng, B.Q., et al., 2014. Cytotoxicity induced by ochratoxin A, zearalenone, and α -zearalenol: effects of individual and combined treatment. *Food. Chem. Toxicol.* 71 (2), 17-24.

Wendel, A., 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77, 325-33.

Zatecka, E., Ded, L., Elzeinova, F., et al., 2013. Effect of tetrabrombisphenol on induction of apoptosis in the testes and changes in expression of selected testicular genes in CD1 mice. *Reproductive Toxicology* 35, 32–39.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Molto, J.C., et al., 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food. Chem. Toxicol.* 45, 1-18.

LEGENDS

FIG.1. Experimental design

FIG. 2. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on (A) number of spermatozoa in epididymis ($F(1,32) = 4.12$; $p < 0.01$) and (B) percentage of motile spermatozoa ($F(1,32) = 12.78$; $p < 0.001$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 7$ animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group. # Indicates a significant difference compared with control group.

FIG. 3. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on plasmatic levels of testosterone ($F(1,32) = 18.94$; $p < 0.01$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 7$ animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. # Indicates a significant difference compared with control group.

FIG. 4. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on serum levels of IL-1 β (4A) ($F(1,32) = 10.90$; $p < 0.01$), IL-6 (4B) ($F(1,32) = 37.17$; $p < 0.001$), IL-10 (4C) ($F(1,32) = 16.64$; $p < 0.01$), TNF- α (4D) ($F(1,32) = 20.47$; $p < 0.001$) and MPO activity (4E) ($F(1,32) = 22.52$; $p < 0.001$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 7$ animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group # Indicates a significant difference compared with control group.

FIG. 5. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on caspase 3 (5A) ($F(1,32) = 21.89$; $p < 0.001$) and caspase 9 activities (5B) ($F(1,32) = 26.88$; $p < 0.001$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 7$ animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group # Indicates a significant difference compared with control group.

FIG. 6. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) and chrysin (5 and 20 mg/kg, p.o.) on levels of 4-HNE (6A) ($F(1,32) = 14.86$; $p < 0.001$) and 8-OHdG (6B) ($F(1,32) = 15.30$; $p < 0.001$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 7$ animals in each group. *** Indicates a significant difference

compared with ZEA group and reverted in levels on control group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group. # Indicates a significant difference compared with control group.

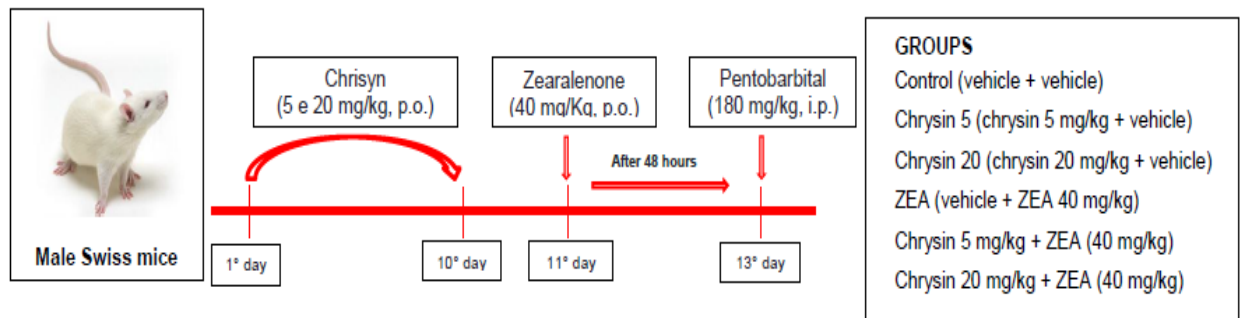


Figure 1

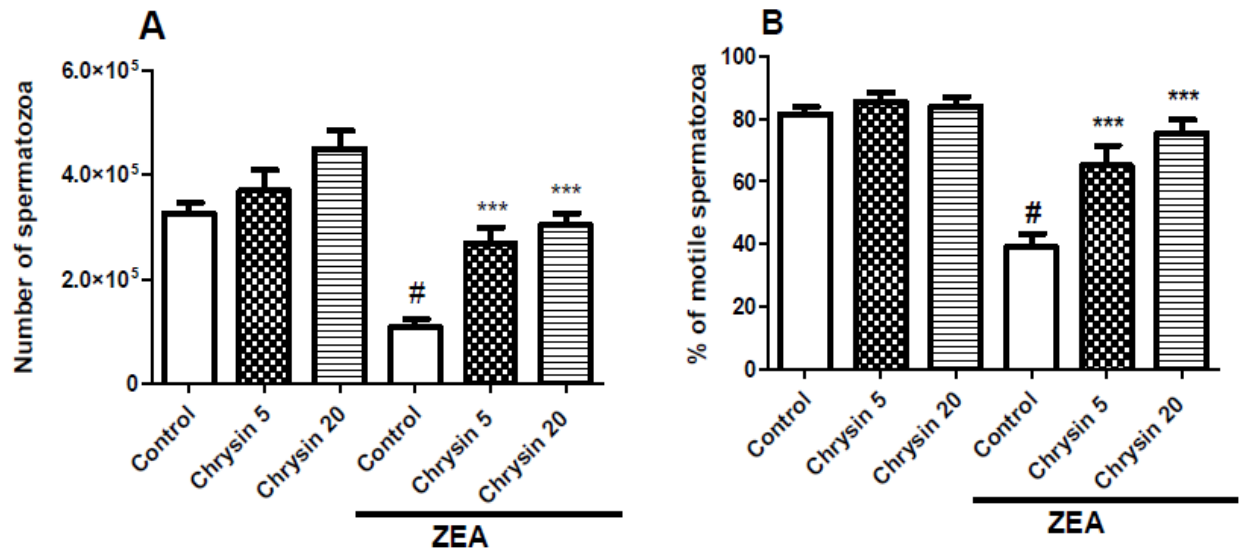


Figure 2

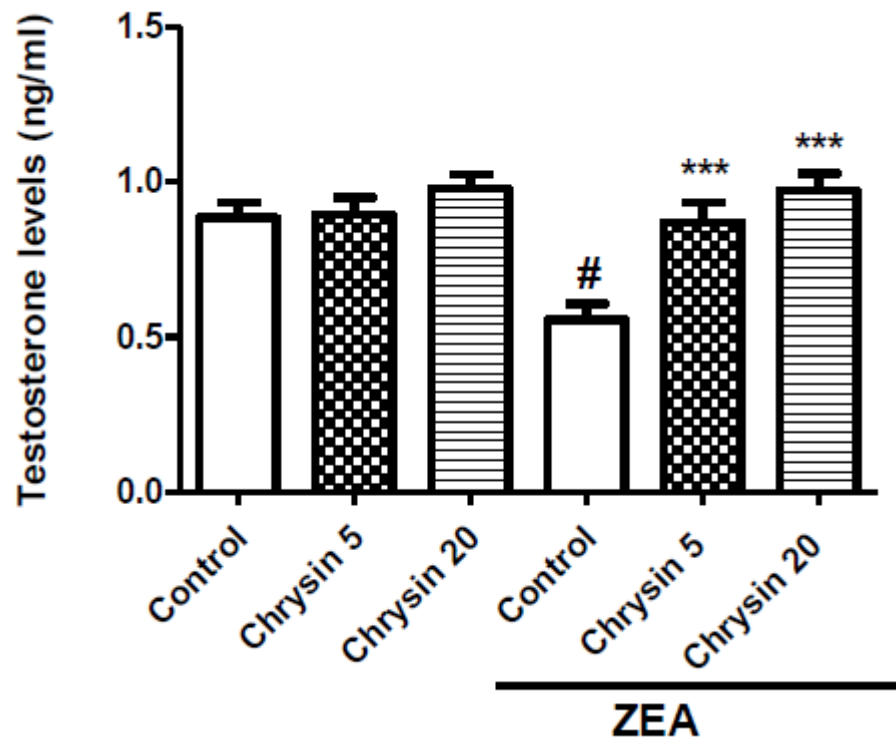


Figure 3

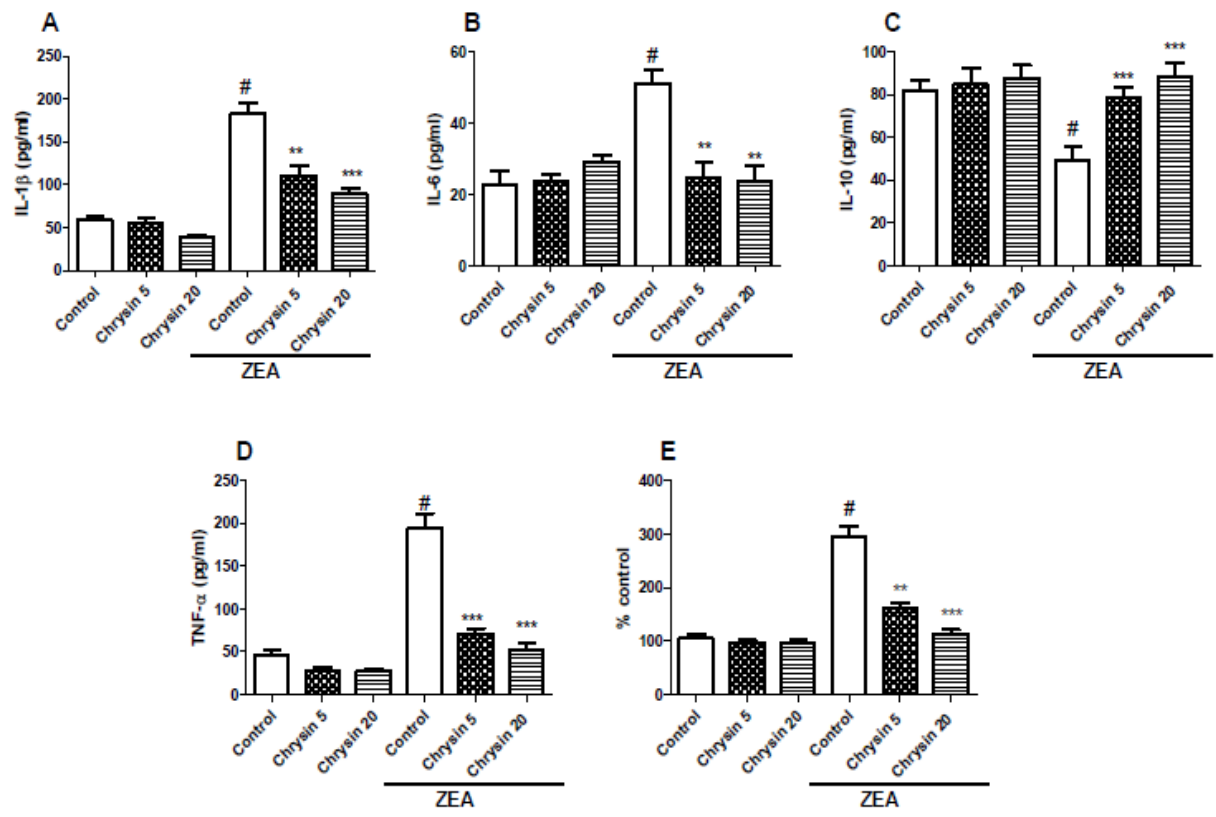


Figure 4

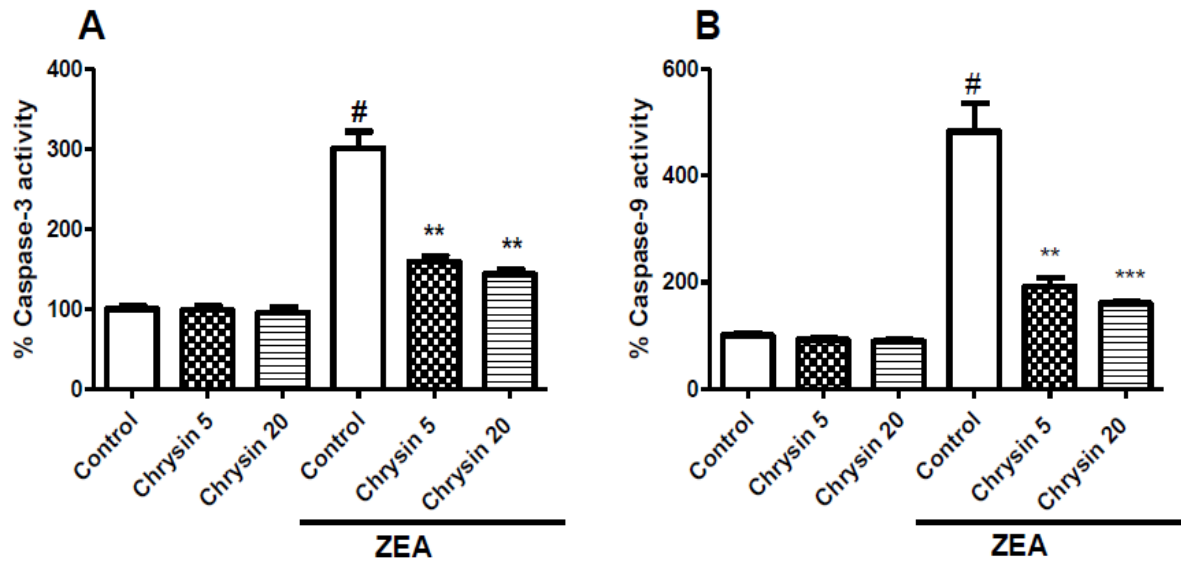


Figure 5

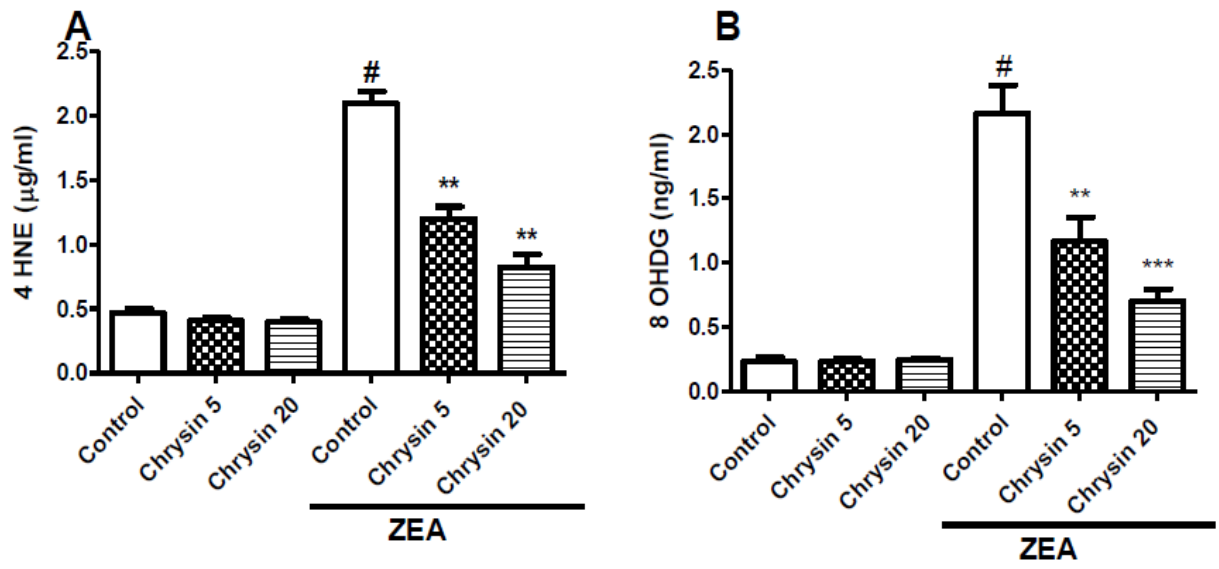


Figure 6

Table 1. Effect of chrysin on activity antioxidant enzymes (GPx, GT, GST, CAT and SOD) in testis of male mice exposed to ZEA

Antioxidant enzymes	GROUPS					
	Control	Chrysin 5	Chrysin 20	Control + ZEA	Chrysin 5 + ZEA	Chrysin 20 + ZEA
GPx	78.4 ± 6.32	90.6 ± 7.68	87 ± 8.8	45.4 ± 5.68 [#]	69.8 ± 4.56 ^{***}	85.4 ± 10.08 ^{***}
GR	63.2 ± 3.44	59.4 ± 5.92	70.6 ± 8.72	31.4 ± 4.08 [#]	55.4 ± 4.32 ^{***}	72 ± 5.6 ^{***}
GST	63.2 ± 4.64	58.6 ± 9.12	62 ± 4.00	30.6 ± 5.52 [#]	56.8 ± 8.56 ^{***}	66.4 ± 11.28 ^{***}
CAT	61.2 ± 12.24	64.4 ± 10.88	70.2 ± 16.16	69.4 ± 17.12	75.4 ± 20.32	85.2 ± 17.04
SOD	88.2 ± 8.24	95 ± 10.8	94.2 ± 8.56	100.6 ± 21.52	98 ± 10.00	98 ± 17.2

GPx: $F(1,26) = 22.40$; ($p < 0.001$) (nmol NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protein); GR: $F(1,26) = 22.40$; ($p < 0.001$) (nmol NADPH per min⁻¹ /mg⁻¹); GST: $F(1,26) = 18.58$; ($p < 0.001$). (nmol CDNB/min/mg of protein); CAT: main effect of ZEA: $F(1,26) = 1.21$; ($p < 0.28$) and chrysin: $F(1,26) = 1.88$; ($p < 0.18$) (nmol H₂O₂ consumed per minute per milligram protein) and SOD: main effect of ZEA: $F(1,26) = 1.54$; ($p < 0.25$) and chrysin: $F(1,26) = 2.01$; ($p < 0.15$) (Units per milligram protein). Data are mean ± S.E.M. for n = 7 animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. # Indicates a significant difference compared with control group. CAT and SOD no significant statistically results.

Table 2. Effect of chrysin on levels non-enzymatic antioxidants (GSH, GSSG, ratio GSH/GSSG, TRAP and TAR) in testis of male mice exposed to ZEA

Non-enzymatic antioxidants	GROUPS					
	Control	Chrysin 5	Chrysin 20	Control + ZEA	Chrysin 5 + ZEA	Chrysin 20 + ZEA
GSH	1.08 ± 0.07	1.126 ± 0.06	1.22 ± 0.11	0.576 ± 0.08 [#]	0.908 ± 0.04 ^{***}	1.07 ± 0.08 ^{***}
GSSG	0.284 ± 0.03	0.286 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.392 ± 0.02 [#]	0.262 ± 0.03 ^{***}	0.284 ± 0.03 ^{***}
GSH/GSSG	3.86 ± 0.26	4.082 ± 0.78	4.002 ± 0.69	1.474 ± 0.20 [#]	3.526 ± 0.45 ^{***}	3.834 ± 0.49 ^{***}
TRAP	102 ± 7.6	111 ± 7.2	133.2 ± 4.96	56.6 ± 9.92 [#]	87.6 ± 3.92 ^{**}	92.8 ± 10.96 ^{**}
TAR	100 ± 6	111 ± 12	118.2 ± 16	53.4 ± 4.32 [#]	81.8 ± 7.04 ^{**}	95. ± 8.00 ^{**}

GSH: F (1,26) = 11.40; (p<0.01) (µg/mg protein); GSSG: F (1,26) = 32.75; (p<0.001) (µg/mg protein); GSH/GSSG: F (1,26) = 19.21; (p<0.001); TRAP: F (1,26) = 3.20; (p<0.05) (% of radical production) and TAR: F (1,26) = 4.20; (p<0.05) (% of radical production). Data are mean ± S.E.M. for n = 7 animals in each group. *** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control

group. ** Indicates a significant difference compared with ZEA group and reverted in levels on control group. # Indicates a significant difference compared with control group.

5 CONCLUSÕES

- A administração da ZEA inibiu a atividade das enzimas antioxidantes GST, GR e GPx, sendo revertida pelo pré tratamento com o flavonoide crisina;
- A ZEA reduziu os níveis dos marcadores de estresse oxidativo GSH, TRAP e TAR além da relação GSH/GSSG, e a administração de crisina impediu a depleção destes marcadores além de reduzir os níveis de GSSG e 4-HNE elevado pela ZEA;
- O tratamento com ZEA aumentou os níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e a atividade da MPO além de reduzir os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10, pré tratamento com o flavonoide crisina reverteu o aumento das citocinas pró-inflamatórias e da atividade da MPO e a redução da interleucina anti-inflamatória IL-10;
- A administração da zearalenona elevou a atividade das caspases 3 e 9 além de elevar os níveis de 8-OHdG;
- Com estes resultados, sugere-se que a administração da ZEA atuou através da depleção das defesas antioxidantes dando início ao processo inflamatório e apoptótico;
- Com base nestes resultados demonstrou-se que o pré-tratamento com o flavonoide crisina impediu a depleção das defesas antioxidantes, atenuando assim os danos inflamatórios e apoptóticos;

6 PERSPECTIVAS

- Estender a abrangência deste verificando os efeitos danosos da zearalenona nos órgãos principalmente fígado e rim;
- Demonstrar um possível efeito protetor do flavonoide crisina contra a toxicidade da ZEA em outros animais como o rato e o coelho;
- Demonstrar possíveis efeitos protetores da crisina diante de outras micotoxinas como a aflatoxina e a ocratoxina.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBES, S.; SALAH-ABBES, J.B.;OUANES, Z.; HOUAS, Z.; OTHMAN, O.; BACHA, H.; ABDEL-WAHHAB, M.A.; OUESLATI, R. Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol*, 6:1251-1258, 2006.

AVANTAGGIATO, G.; HAVENAAR, R.; VISCONTI, A. Assessing the zearalenone binding activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal model. *Food and Chemical Toxicology*, 41:1283–1290, 2003.

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

BENAVENTE-GARCÍA, O. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem*, 1-6, 1999.

BIEHL, M.L.; PRELUSKY, D.B.; KORITZ, G.D.; HARTIN, K.E.; BUCK,W.B.; TRENHOLM, H.L. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121:152–159, 1993.

BOEIRA, S.P., FILHO, C.B., DEL’FABBRO, L., et al. Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice. *Toxicon*, 60:358–366, 2012.

BOEIRA, S.P., FILHO, C.B., DEL’FABBRO, L., et al. Lycopene treatment prevents oxidative stress, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone in Swiss mice. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 66:179–185, 2014.

BOKKENHEUSER, V. D.; SHACKLETON, C. H. L.; WINTER, J. Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem J*, 248:953-6, 1987.

BORUTOVA, R.; FAIX, S.; PLACHA, I.; GRESAKOVA, L.; COBANOVA, K.; LENG, L. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers. *Archives of Animal Nutrition.*, 62:303–312, 2008.

CAST. *Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems*. Ed. Richard, L.; Payne, A. 139:199, 2003.

CASTELLS, M.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: a review. *Food Additives and Contaminants*, 22:150–157, 2005.

CIFTCI, O.; TANYILDIZI, S.; GODEKMERDAN, A., et al. Protective effect of curcumin on immune system and body weight gain on rats intoxicated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Immunopharmacol. Immunotox.*, 32:99–104, 2010.

CIFTCI, O.; OZDEMIR, I.; AYDIN, M. et al. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia*, 44:181–186, 2012.

CREPPY, E.E. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicology Letters*, 127:19–28, 2002.

DORIC', M.; RADOVIC', S.; BABIC', M.; KUSKUNOVIC', S.; TOMIC', I.; SELAK, I. Zearalenone-induced lymphophagocytosis (T cell apoptosis) on the rat's thymus. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 7:66–70, 2007.

FINK-GREMMELS, J.; MALEKINEJAD, H. Review: Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137: 326-341, 2007.

FISCHER, N. L.; BURGUESS, L. W.; TOUSSOUN, T. A.; NELSON, P. E. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology*, 72:151-153, 1982.

GAUMY, J. L.; BAILLY, J.D.; BURGAT, V.; GUERRE, P. Zéaralénone: Propriétés et toxicité expérimentale. *Revue de médecine vétérinaire*, 152:219-234, 2001.

HASSEN, W.; AYED-BOUSSEMA, I.; OSCOZ, A. A.; LOPEZ ADE, C.; 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*, 232:294-302, 2007.

HEBATALLAH, A.; DARWISH, H.; ARABA, R.M. Chrysin alleviates testicular dysfunction in adjuvant arthritic rats via suppression of inflammation and apoptosis: Comparison with celecoxib. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279:129–140, 2014.

IARC. Overall evaluations of carcinogenicity to humans. International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs, 1–73:1–36, 1999.

JANA, K.; YIN, X.; SCHIFFER, R.B. et al. Chrysin, a natural flavonoid enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression in mouse Leydig cells. *J. Endocrinol*, 19:315–32, 2008.

JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Zearalenone. In *Safety Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants*, WHO Food Additives Series, 44:393–482, 2000.

JECFA. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Geneva: World Health Organization; Fifty-sixth meeting, 2001.

KÖPPEN, R.; RIEDEL, J.; PROSKE, M. et al. Photochemical trans-/cis-isomerization and quantitation of zearalenone in edible oils. *J. Agric. Food Chem*, 60:11733-40, 2012.

KUMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. *Crop Protection*, 27:891-905, 2008.

KUIPER-GOODMAN, T.; SCOTT, P.M.; WATANABE, H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7:253–306, 1987.

KWON-CHUNG, K. J. & BENNETT, J. E. Concentrations of airborne *Aspergillus* compared to the incidence of invasive aspergillosis: lack of correlation. *Medical Mycology*. Philadelphia: ed Lea & Febiger, 1992.

LEUNG, K.; DIAZ-LLANO, G.; SMITH, K. Mycotoxins in pet food: a review on worldwide prevalence and preventative strategies. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54:9623-9635, 2006.

LOPES, R. C.; CASALI, V. W. D.; BARBOSA, L. C. A.; CECON, P. R. Caracterização isoenzimática de oito acessos de Erva-de-bicho. *Horticul. Brás*, 21:433-437, 2003.

LUCA, A.J. Harmful fungi in both Agriculture and Medicine, *Revista Iberoamericana de Micologia*, 24:3-13, 2007.

LACAZ, C.S. Guia para identificação. Fungos Actinomicetos e Algas, São Paulo, Sarvier, 1998.

LIOI, M. B.; SANTORO, A.; BARBIERI, R.; SALZANO URSINI, V. Ochratoxin and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*, 557:19–24, 2004.

MALEKINEJAD, H., MAAS-BAKKER, R., FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet. J*, 172:96-102, 2006.

MCNUTT, S. H.; PURWIN, P.; MURRAY, C. Vulvovaginitis in swine. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 26: 484–92, 1928.

MÍDIO, A.; MARTINS, D. *Toxicologia dos Alimentos*, Varela Editora Livraria CTDA S. Paulo; 79-83, 2000.

MINERVINI, F. & DELL'AQUILA, M.E. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci*, 9:2570-2584, 2008.

MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M.; NELSON, G. H. F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. In *Microbial Toxins*, Kadis S, Ciegler A, Ajl SJ (eds). Academic Press, New York, 2:107–38, 1971.

MIROCHA, C. J.; CHRISTENSEN, C. M. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. In *Mycotoxins*, Purchase IFH (ed.). Elsevier, New York, 129–48, 1974.

OLIVEIRA, G.R. Análises micológicas e micotoxicológicas de rações de frangos de corte no município de São José do Vale do Rio Preto – RJ. Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – Instituto de Veterinária para obtenção grau de Magister Scientiae em Microbiologia Veterinária, orientada por Carlos Rosa, Brasil, 2006.

OLSEN, M.; PETTERSSON, H.; KIESSLING, K.H. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 48:57-161, 1981.

OMS. Organizacion Mundial de la Salud. Criterios de salud ambiental Micotoxinas. Organización Panamericana de la Salud, p. 133, 1983.

PETERSON, J & DWYER J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Research*, 18(12):1995- 2018, 1998.

PITT, J.I. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38:17-22, 2000.

PRELUSKY, D.B.; SCOTT, P.M.; TRENHOLM, H.; LAWRENCE, G.A. Minimal transmission of zearalenone to milk of dairy cows. *J. Environ. Sci. Health.*, 25:87–103. 1990.

PUSHPAVALLI, G. C.; VEERAMANI, K.V.; PUGALENDI, V. Influence of chrysin on hepatic marker enzymes and lipid profile against d-galactosamine-induced hepatotoxicity rats. *Food Chem. Toxicol*, 48:1654–1659, 2010.

RAGO, V.; SICILIANO, L.; AQUILA, S.; CARPINO, A. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. *Reprod Biol Endocrinol*, 4:36, 2006.

RAMOS, A. J.; FINK-GREMMELS, J.; HERNANDEZ, E. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive adsorbent compounds. *Journal of Food Protection*, 59: 631-641, 1996.

REIS, M.; CASA T. Manual de Identificação e controle de doenças de milho. Passo Fundo: Aldeia Norte, 80, 1996.

SALAH-ABBES, J. B.; ABBES, S.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R. Raphanus sativus extract protects against ZEN-induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. *Toxicol*, 53:525-533, 2009;

SALAH-ABBÈS, J.B.; ABBÈS, S.; ABDEL-WAHHAB, M.; OUESLATI, R. Immunotoxicity of zearalenone in Balb/c mice in a high subchronic dosing study counteracted by Raphanus sativus extract. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 32:628–636, 2010.

SALAY, E.; MERCADANTE, A. Z. Mycotoxins in Brazilian corn for animal feed: occurrence and incentives for the private sector to control the level of contamination. *Food Control*, 13:87–92, 2002.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. In: Diaz, D. (Ed.), *The Mycotoxin Blue Book*, 225-234, 2005.

SANTUARIO M. J. Micotoxicoses em Suínos. *PorkWorld*, 1:1 –22, 2003.

SERRA, RITA. Micoflora das uvas portuguesas e seu potencial para a contaminação das uvas com micotoxinas, com destaque para a ocratoxina A. Disponível em <http://hdl.handle.net/1822/2579>. Acessado em 01/012015.

SHURTLEFF, C. Compendium of corns diseases. Saint Paul: The American Phytopathological Society, 105, 1992.

SOBROVA, P.; ADAM, V.; VASATKOVA, A.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity, *Interdisciplinary Toxicology*, 3:101-106, 2010.

STABILE, V.; RUSSO, M, CHIEFFI, P. 17beta-estradiol induces Akt-1 through estrogen receptor-beta in the frog (*Rana esculenta*) male germ cells. *Reproduction* 132:477-484, 2006.

SUN, X.; XINGXING H.; XUE, K.S. et al. Biological detoxification of zearalenone by *Aspergillus niger* strain FS10. *Food and Chemical Toxicology* 72:76–82, 2014.

TAKEMURA, H.; SHIM,J.; SAYAMA, K.; TSUBURA, A.; ZHU, B.; SHIMOI, K. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 103:170–177, 2007.

THOMAS, J.L.; DUAX, W.L.; ADDLAGATTA, A.; KACSOH, B.; BRANDT, S.E.; NORRIS, W. Structure/function aspects of human 3[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 215:73-82, 2004.

URRY, W. H.; WEHRMEISTER, H. L.; HODGE, E. B.; HIDY, P. H. The structure of zearalenone. *Tetrahedron letters*, 27:3109–3114, 1966.

YANG, J.Y.; WANG, G.X.; LIU, J.L.; FAN, J.J.; CUI, S. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol*, 24:381-387, 2007.

WALLE, T. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Rad Biol Med*, 36:829-37, 2004.

WALLE, T.; OTAKE, Y.; BRUBAKER, J. A.; WALLE, U. K.; HALUSHKA, P. V. Disposition and metabolism of the flavonoid chrysin in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol*, 51:143-6, 2001.

WANG, N.Y.; ZHANG, Y.Z.; PENG, D.S. et al. Qi Interaction of zearalenone and soybean isoflavone on the development of reproductive organs, reproductive hormones and estrogen receptor expression in prepubertal gilts. *Animal Reproduction Science*, 122:317–323, 2010.

WANG, H.W.; WANG, J.Q.; ZHENG, B.Q. et al. Cytotoxicity induced by ochratoxin A, zearalenone, and α -zearalenol: effects of individual and combined treatment. *Food. Chem. Toxicol*, 71(2), 17-24, 2014.

ZHANG, S.; WANG, X.; SAGAWA, K.; MORRIS, M. Flavonoids chrysin and benzoflavone, potent breast cancer resistance protein inhibitors, have no significant effect on topotecan pharmacokinetics in rats or mice. *Drug Metabolism and Disposition*, 33:341-348, 2005.

ZARZECKI, M. S.; ARAUJO, S. M.; BORTOLOTTI, V. C.; DE PAULA, M. T.; JESSE, C. R.; PRIGOL, M. Hypolipidemic action of chrysin on Triton WR-1339-induced hyperlipidemia in female C57BL/6 mice. *Toxicol Reports*, 1:200-8, 2014.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J.M.; MOLTO, J.C. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food. Chem. Toxicol*, 45:1-18, 2007.

ANEXO A – Protocolo de aprovação do projeto pela Comissão de ética no uso de animais (CEUA-UNIPAMPA).



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
(Lei nº 11.640, de 11 de janeiro de 2008)

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Fone: (55) 3413 4321, E-mail: ceua@unipampa.edu.br

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: **020/2014**

Título: **Avaliação do efeito do flavonóide crisina na toxicidade induzida pela Zearalenona em camundongos**

Data da aprovação: **11/06/2014**

Período de vigência do projeto: De: **06/2014** Até: **06/2017**

Pesquisador: **CRISTIANO RICARDO JESSE**

Campus: **ITAQUI**

Telefone: **(55) 3433-1669**

E-mail: **cristianoricardojesse@yahoo.com.br**

Alessandra S. K. Tamajusuku Neis
Professor Adjunto
Coordenadora da CEUA/UNIPAMPA