

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA  
CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

TAÍS FERNANDA ANDRZEJEWSKI KAMINSKI

**EFEITOS GENOTÓXICO E CITOTÓXICO *EX VIVO* DA MICOTOXINA FUMONISINA B<sub>1</sub> EM LEUCÓCITOS HUMANOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

URUGUAIANA  
2017

**TAÍS FERNANDA ANDRZEJEWSKI KAMINSKI**

**EFEITOS GENOTÓXICO E CITOTÓXICO *EX VIVO* DA MICOTOXINA FUMONISINA B<sub>1</sub> EM LEUCÓCITOS HUMANOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para o grau de MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira

**URUGUAIANA  
2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA CAMPUS URUGUAIANA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

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

**EFEITOS GENOTÓXICO E CITOTÓXICO *EX VIVO*  
DA MICOTOXINA FUMONISINA B<sub>1</sub> EM  
LEUCÓCITOS HUMANOS**

Elaborada por  
**Taís Fernanda Andrzejewski Kaminski**

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em: 21 de Fevereiro de 2017

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira  
Orientador  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA

---

Prof. Dr. Alexandre Meneghelo Fuentefria  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – UFRGS

---

Prof. Dr. Marcus Vinícius Morini Querol  
Curso Tecnológico de Aquicultura - UNIPAMPA

*Aos meus pais, Eugenio e Ladis,  
Minha irmã Viviani,  
E ao meu esposo Tiago, pelo  
carinho, apoio e incentivo.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha saúde e minha cura, pela força que me concedeu e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais, que muito contribuíram para o meu crescimento nesses 2 anos de mestrado.

Minha gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. Luís Flávio Souza de Oliveira, pela sua atenção, disponibilidade e paciência, bem como por seus ensinamentos, me guiando e estimulando, dividindo seu inestimável saber ao longo desses anos de trabalho, os quais para mim foram de suma importância. Muito obrigada pela sua amizade e por ter confiado em mim, permitindo a minha entrada no grupo de pesquisa. Para sempre serei grata.

Agradeço ao prof. Michel Mansur Machado, que sempre esteve disponível me auxiliando. Muito obrigada por suas contribuições e tempo despendido.

Ao professor Flávio Ferreira, pelas contribuições em nosso trabalho, juntamente com o LaRPeM - Laboratório de análises de Resíduos de Pesticidas e Micotoxinas da UNIPAMPA, campus Itaqui.

A professora Fabiane Moreira Farias, que gentilmente disponibilizou seu laboratório para as pesagens de nossas amostras.

Agradeço a todos colegas do Grupo de Pesquisa em Toxicologia Celular, lugar onde conheci pessoas maravilhosas, onde aprendi muito e criei laços de amizade que serão eternos. Nunca esquecerei os nossos momentos de descontração, do café de todas as manhãs, das risadas e das nossas conversas. Gurias, só tenho a agradecer toda a ajuda que recebi durante as minhas análises, pelo tempo que vocês disponibilizaram a se dedicar ao meu trabalho! E nunca esqueçam, Deus está com cada um, sejamos sempre pessoas de bom coração e nunca nos faltará nada.

A minha família, especialmente meus pais, os quais sempre me apoiaram, e fizeram acreditar que nunca é tarde para irmos em busca dos nossos sonhos. A minha irmã Viviani, que sempre esteve ao meu lado, me aconselhando e incentivando. Obrigada por me impulsionarem a seguir a vida acadêmica e não me deixar desistir perante as dificuldades.

Ao meu esposo Tiago, pelo incentivo, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos. Saiba que és um exemplo para mim, tanto como pessoa quanto professor. Te admiro muito! Te amo!!

“Só se vê bem com o coração, o essencial é invisível aos olhos”.

O Pequeno Príncipe

## RESUMO

Os fungos produzem vários metabólitos secundários, onde muitos destes têm sido associados com a indução de efeitos tóxicos em animais e seres humanos. O efeito toxicológico, incluindo o carcinogênico, tem sido observado em mais de 300 micotoxinas estruturalmente conhecidas. As Fumonisinias são micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, as quais frequentemente contaminam vários alimentos, especialmente milho e seus derivados, induzindo ao aparecimento de quadros patológicos em humanos. A Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) é a mais prevalente, respondendo por aproximadamente 70% do total das micotoxicoses. Esta micotoxina está associada com leucoencefalomalácia (LEM) em cavalos, edema pulmonar em suínos e hepatocarcinoma em ratos, além de estar relacionada à inibição da biossíntese de esfingolípideos e ao aumento do risco de cancro esofágico em seres humanos. O presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos citotóxico e genotóxico da fumonisina B<sub>1</sub> através do teste de viabilidade celular e do teste de proliferação celular em cultura de leucócitos humanos. As concentrações testadas foram de 200; 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 µg/mL e 300; 30; 3; 1; 0,1; 0,01 fg/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas sendo que, como controle positivo foi utilizado H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4mM e, como controle negativo, tampão PBS 7,4. Com exceção das concentrações de 3fg/mL, 0,1fg/mL e 0,01fg/mL, todas as concentrações testadas demonstraram ser citotóxicas (p<0,05). Em relação ao teste de genotoxicidade, exceto as concentrações de 0,1fg/mL e 0,01fg/mL, demonstraram interferir significativamente na proliferação celular. Podemos concluir, de forma inédita, que somente em concentrações extremamente baixas, na ordem de fentogramas por mililitro, a Fumonisina B<sub>1</sub> diminuiu os danos induzidos em leucócitos humanos.

**Palavras-chave:** Fumonisina B<sub>1</sub>, micotoxinas, genotoxicidade, citotoxicidade.

## ABSTRACT

Fungi produce several secondary metabolites, where many of these have been associated with the induction of toxic effects in animals and humans. The toxicological effect, including the carcinogenic, has been observed in more than 300 structurally known mycotoxins. Fumonisins are mycotoxins produced mainly by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, which often contaminate various foods, especially corn and its derivatives, leading to the appearance of pathological conditions in humans. Fumonisin B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) is the most prevalent, accounting for approximately 70% of the total mycotoxicosis. This mycotoxin is associated with leukoencephalomalacia (LEM) in horses, pulmonary edema in pigs and hepatocarcinoma in rats, besides being related to the inhibition of sphingolipid biosynthesis and to the increasing risk of esophageal cancer in humans. The present study aimed to investigate the cytotoxic and genotoxic effects of fumonisin B<sub>1</sub> through the cell viability and the cell proliferation test in human leukocyte culture. The tested concentrations tested were 200; 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 µg/mL e 300; 30; 3; 1; 0,1; 0,01 fg/mL. All the tests were performed in triplicates, and it was used H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4mM as a positive control, and PBS 7.4 buffer as a negative control. All concentrations tested were cytotoxic (p <0.05), except the 3fg/mL, 0,1fg/mL and 0,01fg/mL concentrations. Regarding to the genotoxicity test, except the 0.1fg/mL and 0.01fg/mL concentrations of, they demonstrated to significantly interfere in the cell proliferation. In an unprecedented way, it can be concluded that only in extremely low concentrations, in the order of phentograms per milliliter, the Fumonisin B<sub>1</sub> decreased the induced damage in human leukocytes.

**Keywords:** Fumonisin B<sub>1</sub>, mycotoxins, genotoxicity, cytotoxicity.

**LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1:** Principais micotoxinas com seus respectivos fungos produtores, substratos e efeitos no homem e nos animais -----13

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1:</b> Estrutura de célula fúngica -----	17
<b>Figura 2:</b> Estrutura química da Fumonisina B <sub>1</sub> -----	21
<b>Figura 3:</b> Via de biossíntese dos esfingolipídeos e rotatividade em uma célula de mamífero-----	26
<b>Figura 4:</b> Resumo da biossíntese dos esfingolipídeos em uma célula animal. -----	27
<b>Figura 5:</b> Estrutura da fumonisina B <sub>1</sub> e das bases esfingóide -----	28
<b>Figura 6:</b> Locais de ação da fumonisina B <sub>1</sub> (FB <sub>1</sub> ) no metabolismo de esfingolipídios	29
<b>Figura 7:</b> Diferenças morfológicas da necrose e apoptose -----	37
<b>Figura 8:</b> Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer -----	40
<b>Figura 9 A-B:</b> Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B <sub>1</sub> -----	43
<b>Figura 10 A-B:</b> Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B <sub>1</sub> -----	44
<b>Figura 11 A-B:</b> Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B <sub>1</sub> -----	47
<b>Figura 12 A-B:</b> Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B <sub>1</sub> -----	48

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A** - Adenina  
**ANOVA** - Análise de variância  
**AP** - Sítio apurímico ou apirimídico  
**BW** - Peso corporal  
**BER** - Reparo por excisão de bases  
**C** - Citosina  
**CE** - Câncer esofágico  
**CER** - Ceramida sintase  
**CDKs** - Proteínas quinases  
**Cdc6** - Cell Divions Cycle 6  
**DHC** - **dessaturase** - diidroceramida dessaturase  
**DNA** - Ácido desoxirribonucleico  
**FANC** - Reparo de crosslink  
**FA<sub>1</sub>** - Fumonisina A<sub>1</sub>  
**FB<sub>1</sub>** - Fumonisina B<sub>1</sub>  
**FB<sub>2</sub>** - Fumonisina B<sub>2</sub>  
**G** - Guanina  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - Peróxido de hidrogênio  
**HepG<sub>2</sub>** - Células do hepatocarcinoma humano  
**HRR** - Recombinação homóloga  
**Kg** - Quilogramas  
**LEM** - Leucoencefalomalácia  
**MCM2-7** - *Minichromosome Maintenance 7*  
**mg** - miligramas  
**mL** - mililitros  
**NER** - Reparo por excisão de nucleotídeos  
**NHEJ** - Reparo por recombinação não homóloga  
**ORC** - Complexo de origem de replicação  
**PCNA** - Antígeno Nuclear de Proliferação Celular  
**ppb** - Partes por bilhão  
**PPE** - Edema pulmonar  
**Pré-RC** - Complexo pré-replicativo  
**RNA** - Ácido ribonucleico  
**rRNA** - Ácido ribonucleico ribossomal  
**Sa** - Esfinganina  
**So** - Esfingosina  
**So-Kinase e -liase** - Esfingosina quinase e liase  
**SPTase** - serina palmitoil transferase  
**T** - Tiamina  
**T<sub>máx</sub>** - Tempo de concentração plasmática máxima  
**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral - Alfa  
**T<sub>1/2</sub>** - Tempo de meia-vida  
 **$\alpha$  e  $\beta$  - ZEA** - Alfa e Beta Zearalenona  
 **$\mu$ g** - Microgramas  
 **$\mu$ L** - Microlitros  
 **$\mu$ M** - Micromolar

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
3.1 FUNGOS .....	16
3.2 MICOTOXINAS: HISTÓRIA, ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	18
3.3 AS FUMONISINAS .....	19
<b>3.3.1 Ocorrência</b> .....	22
<b>3.3.2 Parâmetros toxicocinéticos</b> .....	23
3.4 OS ESFINGOLIPÍDEOS .....	24
3.5 TOXICIDADE DA FB <sub>1</sub> .....	27
<b>3.5.1 Mecanismo de ação dos esfingolipídeos e seus metabólitos na toxicidade da FB<sub>1</sub></b> .....	29
3.6 CICLO CELULAR .....	33
3.7 GENOTOXICIDADE.....	34
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
4.1 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.....	39
4.2 PREPARO DA CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	39
4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS EM CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS.....	39
<b>4.3.1 Viabilidade celular</b> .....	40
<b>4.3.2 Proliferação celular</b> .....	40
4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
5.1 CITOTOXICIDADE .....	42
5.2 GENOTOXICIDADE .....	46
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	50
<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b> .....	51
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

Os fungos produzem vários metabólitos secundários, onde muitos destes têm sido associados com a indução de efeitos tóxicos em animais e seres humanos, como é o caso das micotoxinas. Micotoxina, por sua vez, é um termo derivado do grego (*Mikes* = fungo e *Toxicum*= veneno), empregado para descrever substâncias tóxicas que são formadas por fungos em diferentes etapas do desenvolvimento micelial (D’MELLO et al., 1997).

Os efeitos toxicológicos, incluindo a carcinogenicidade, têm sido observados em mais de 300 micotoxinas estruturalmente conhecidas. A exposição humana às micotoxinas pode resultar do consumo de alimentos derivados de plantas contaminadas, bem como de seus metabólitos em produtos de origem animal, como carne, ovos ou exposição ao ar contendo toxinas (ZAIN, 2010). Com isso, existe uma diversidade de micotoxinas em diferentes tipos de alimentos (Quadro 1), que resultam em vários efeitos sobre humanos e animais.

Principais substratos	Principais fungos produtores	Principal toxina	Principais efeitos
Amendoim, milho, castanha-do-Pará	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B <sub>1</sub>	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Trigo, aveia, cevada, milho e arroz	<i>Penicillium citrinum</i>	Citrinina	Nefrotóxica para suínos
Centeio e grãos em geral	<i>Claviceps Purpúrea</i>	Ergotamina	Gangrena de extremidade e convulsões
Milho	<i>Fusarium verticillioides</i>	Fumonisinias	Câncer de esôfago
Cevada, café e vinho	<i>Aspergillus ochraceus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	Ocratoxina	Hepatotóxica, nefrotóxica e carcinogênica
Frutas e sucos de frutas	<i>Penicillium expansum</i> e <i>Penicillium griseofulvum</i>	Patulina	Tecido gastrointestinal, rins, fígado e sistema imunológico.
Milho, cevada, aveia, trigo e centeio	<i>Fusarium sp.</i> <i>Myrothecium sp.</i> <i>Stachybotrys sp.</i> <i>Trichothecium sp.</i>	Tricotecenos: T2, neosolaniol, fusanona x, nivalenol,	Baixa toxicidade; síndrome de feminização em suínos

		deoxinivalenol	
--	--	----------------	--

**Quadro 1:** Principais micotoxinas com seus respectivos fungos produtores, substratos e efeitos no homem e nos animais (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

A Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) é uma micotoxina cancerígena produzida por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum*, sendo especialmente encontrada em plantações de milho (CHUTURGOON et al., 2015).

A manifestação mais grave de intoxicação causada pela ingestão de milho contaminado com FB<sub>1</sub> é a leucoencefalomalácia (LEM), uma doença cerebral fatal em equinos e coelhos. Em suínos, o principal sintoma de toxicidade das fumonisinas foi denominado edema pulmonar; já em aves, os efeitos adversos caracterizam-se pela redução no desenvolvimento, problemas cardíacos, imunossupressão, degeneração e necrose hepática. Em seres humanos, os estudos epidemiológicos relacionaram os altos índices de câncer esofágico em populações que consomem milho com altos níveis de fumonisinas (MINAMI et al., 2004).

Apesar de a literatura especializada trazer abordagens a respeito da gravidade da intoxicação por FB<sub>1</sub>, ainda há divergências no que se refere à concentração responsável pelo início dos danos celulares em humanos, incluindo a estrutura do DNA. Dessa forma, são necessários estudos que respondam a essa falta de informações no assunto. Sendo assim, este trabalho teve por finalidade verificar as concentrações limites quanto ao início de quebras homeostáticas nos parâmetros supracitados, aclarando aspectos que versam citotoxicidade e genotoxicidade desta micotoxina.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar efeitos citotóxico e genotóxico *ex vivo* da micotoxina FB<sub>1</sub> em leucócitos humanos.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito citotóxico da FB<sub>1</sub> em culturas de leucócitos humanos, através dos testes de viabilidade.
- Determinar a concentração mínima de FB<sub>1</sub> capaz de induzir citotoxicidade celular em cultura de leucócitos humanos.
- Avaliar o efeito genotóxico da FB<sub>1</sub> sobre a proliferação celular em cultura de leucócitos humanos.
- Determinar a concentração mínima de FB<sub>1</sub> capaz de influenciar a proliferação celular em cultura de leucócitos humanos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

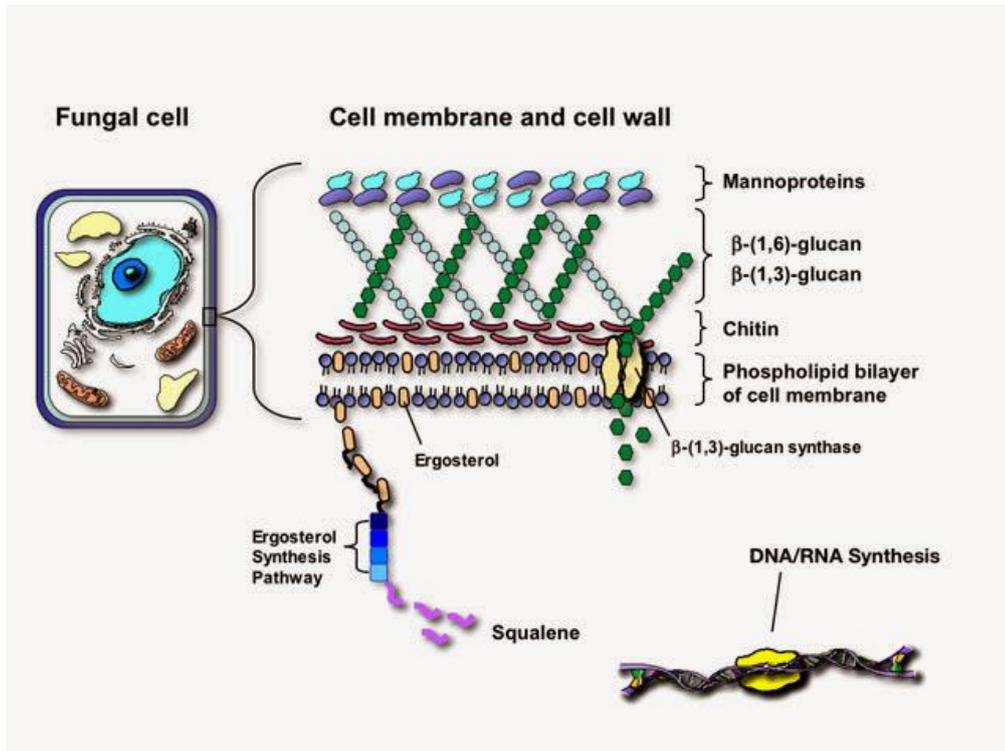
#### 3.1 FUNGOS

O Reino Fungi compreende um conjunto de organismos eucarióticos, heterotróficos, essencialmente aeróbicos, com limitada capacidade anaeróbica, podendo sintetizar lisina pela via biossintética do ácido L- $\alpha$ -aminoadípico. Utilizam como material de reserva energética o glicogênio, são desprovidos de clorofila e possuem o núcleo rodeado por membrana celular. (MENDES-GIANINI et al., 2001).

Os fungos possuem reprodução assexuada, onde inclui a propagação vegetativa de hifas e leveduras, bem como a frutificação vegetativa, isto é, a formação de esporos assexuais. As hifas alongam-se numa zona imediatamente inferior à ponta em que a parede celular é particularmente elástica. Este processo de crescimento apical também pode incluir a formação de edemas que se desenvolvem em hifas laterais, que pode por sua vez, se ramificar para fora. As leveduras reproduzem-se por brotação sendo que, algumas leveduras se propagam nas formas de levedura e hifa (KAYSER, 2005).

Na frutificação vegetativa, é formado um tipo de forma propagativa, os esporos assexuais. Os esporos assexuados vêm em vários tipos morfológicos: conídios, esporângios, artrósporos e blastoporos. Os esporos sexuais raramente são produzidos nos tipos de fungos que parasitam os tecidos humanos (KAYSER, 2005).

Ainda segundo Mendes-Gianni e Melhem (2001), os fungos apresentam parede celular rígida e quitinosa, mitocôndrias semelhantes às de células de plantas e animais, além de vacúolos, retículo endoplasmático, microtúbulos e ribossomos. A membrana plasmática contém ergosterol, rRNA 80s e microtúbulos compostos de tubulina, e o complexo de Golgi nem sempre está presente (Figura 1). São seres ubiqüitários, ou seja, vivem em qualquer lugar que tenha matéria orgânica em decomposição. Podem ser unicelulares ou multicelulares, e divididos basicamente em filamentosos e leveduras, dependendo de sua morfologia.



**Figura 1.** Estrutura de célula fúngica. Disponível em: [www.viralinfection.info](http://www.viralinfection.info). Acesso em 05/10/2016.

O elemento de base morfológica de fungos filamentosos é a hifa. Ao conjunto de hifas dá-se o nome de micélio. A forma básica de um fungo unicelular é a célula de levedura. Fungos dimórficos geralmente assumem a forma de leveduras na fase parasitária e a forma de micélio na fase de saprófitas. As paredes celulares dos fungos consistem em cerca de 90% de hidratos de carbono (de quitina, glucanos, mananos) e membranas de fungos são ricas em tipos de esterois que não são encontrados em outras membranas biológicas (por exemplo, ergosterol) (KAYSER, 2005).

Todos os fungos são heterotróficos de carbono, sendo assim, são dependentes de nutrientes exógenos como fontes de carbono orgânico e, com algumas exceções, existem ainda os fungos aeróbios obrigatórios. Muitas espécies são capazes de manter a atividade metabólica no mais básico dos meios nutrientes. Os tipos metabólicos conhecidos de fungos incluem termófilos, psicrófilos, acidófilos e os halófilos (KAYSER, 2005).

O sistema vegetativo dos fungos filamentosos é constituído de hifas ou micélios, contendo septos, os quais podem ser regulares ou não. Em geral, as hifas são oriundas de esporos que germinam sob condições adequadas de temperatura e umidade. As hifas podem ser vegetativas, para absorverem nutrientes; ou especializadas, para originarem o sistema reprodutor para formação de esporos. A observação microscópica do sistema reprodutivo é

fundamental para a classificação desses fungos, permitindo a identificação do gênero e, muitas vezes, da espécie (MENDES-GIANINI et al., 2001).

As capacidades metabólicas de fungos são exploradas na indústria alimentar, como na produção de pão, vinho, cerveja, queijo, ou de proteínas de célula única e na indústria farmacêutica (por exemplo, na produção de antibióticos, enzimas, ácido cítrico, dentre outras várias aplicações). Contudo, a atividade metabólica de fungos pode também ser um fator prejudicial. A infestação por fungos pode destruir alimentos, estruturas de madeira, têxteis e outros substratos. Também podem causar numerosas doenças em plantas, o que induz a consideráveis quebras na produção agrícola (KAYSER, 2005).

Os fungos possuem grande capacidade de colonização e exploração de substratos orgânicos vivos e em decomposição, onde esta capacidade diferenciada de exploração de substratos está intimamente relacionada com as características físicas e ambientais aos quais o fungo é exposto, bem como as exigências nutricionais inerentes a cada espécie fúngica, que são essenciais ao seu desenvolvimento (SIDRIM et al., 2004).

### 3.2 MICOTOXINAS: HISTÓRIA, ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A história das micotoxinas começa em 1960, quando um surto de mortes inexplicáveis de aves no Reino Unido (especialmente perus) foi investigado. O surto ficou mundialmente conhecido como *turkey x disease*. Chegou-se a conclusão que o problema estava na ração, a qual havia sido produzida com amendoim importado da África e do Brasil. Este amendoim estava contaminado com uma substância fluorescente produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. A partir de 1962, quando se estabeleceu as causas do surto, pesquisas subsequentes encontraram outros fungos produtores de diferentes substâncias tóxicas (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

As micotoxinas compreendem uma grande variedade de estruturas químicas de baixo peso molecular, agrupadas de acordo com o grau e tipo de toxicidade ao homem e animais. Algumas micotoxinas são relativamente simples, comparadas a toxinas bacterianas. A grande variabilidade na natureza química das micotoxinas impõe a necessidade de numerosos métodos de extração para extraí-las dos alimentos, dificultando também o seu controle. Além disso, vários procedimentos devem ser utilizados para identificação e quantificação das mesmas para responder às exigências técnicas de importadores e de órgãos de regulamentação (IAMANAKA, et al., 2010).

A biossíntese de micotoxinas é determinada geneticamente e é intimamente relacionada às vias metabólicas principais (aminoácidos e ácidos graxos). A produção de toxina e o grau de contaminação de alimentos e gêneros alimentícios são regulados por fatores ambientais, composição e textura do substrato, umidade e temperatura. As plantas são mais susceptíveis à invasão fúngica sob condições de estresse, como seca ou excesso de irrigação, danos por insetos e exposição a pesticidas. Além disso, a suscetibilidade da planta determina as características do crescimento fúngico e a taxa de produção de toxinas (MINAMI et al., 2004).

Doenças em humanos e animais, que são resultantes do consumo de micotoxinas, são conhecidas como micotoxicoses. Os órgãos mais afetados quando há contaminação são: fígado, pulmão, rim, músculos e sistema nervoso (SILVA, 2005).

Os piores efeitos das micotoxinas no homem tendem a ser crônicos, de difícil associação com o consumo de alimentos contaminados. Uma vez que as micotoxinas são termoestáveis, a abordagem preventiva em relação a elas é de suma importância. Porém, evitar a contaminação dos fungos é praticamente impossível, visto que os principais bolores toxigênicos são bastante disseminados no ambiente. Com isso, o homem pode ser contaminado por micotoxinas através do consumo de alimentos processados ou *in natura* (FOOD INGREDIENTS BRASIL, 2009).

Existem vários critérios para avaliar o impacto econômico das micotoxinas em seres humanos e em animais. As considerações incluem a perda da vida humana e animal, cuidados de saúde e os custos dos cuidados veterinários, perda de produção de gado, perda de culturas alimentares, os custos regulatórios e custos de pesquisa com foco em aliviar o impacto e a gravidade do problema de micotoxinas (ZAIN, 2010).

Finalmente, há também os custos com saúde humana, que não são adequadamente bem definidos, levando-se em consideração as variáveis envolvidas no cálculo dos mesmos. Adicionalmente, os estudos acerca dos efeitos deletérios destas substâncias na saúde humana ainda são insuficientes para conhecer sua abrangência, severidade e morbidade. Desta forma, não há como estimar a magnitude do impacto econômico ocorrido na saúde pública (SANTOS et al., 2014).

### 3.3 AS FUMONISINAS

Após o surto na África do Sul durante 1970, foi possível chegar ao predomínio isolado do *Fusarium verticillioides* a partir do bolor de milho, sendo caracterizado por

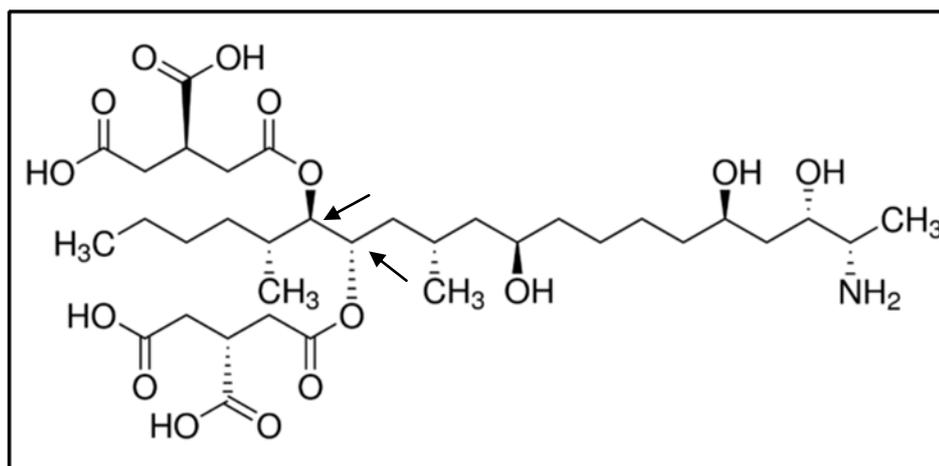
lesões necróticas liquefativa na matéria branca dos hemisférios cerebrais de cavalos, fato conhecido por leucoencefalomalácia equina (LEM). O envolvimento do fungo *F. verticillioides* nos casos de LEM foi posteriormente confirmado através de vários isolamentos deste fungo, e as alterações patológicas foram descritas em detalhe. As ocorrências de proliferação de ductos biliares, aumento do número de figuras mitóticas, hepatócitos multinucleadas e grandes núcleos hipercromáticos nos fígados destes cavalos foram as primeiras indicações de que *F. verticillioides* poderia ser um fungo tóxico e cancerígeno (MARASAS, 2001).

Com isso, iniciou-se um estudo sobre o possível papel das toxinas fúngicas em humanos na etiologia do câncer esofágico, na região sul de Transkei, na África do Sul, um dos mais altos do mundo, e na região norte, a qual é mais baixa. A dieta básica em ambas as áreas era milho cultivado pela própria população, e o fungo *F. verticillioides* mostrou-se o mais prevalente no milho consumido por pessoas em áreas com um elevado índice de câncer esofágico (CE). Após muitos estudos, em 1988 foi desvendada a estrutura química do composto cancerígeno que estava causando tantos danos, tanto em animais quanto humanos, a Fumonisina B<sub>1</sub> (MARASAS, W. F. O., 2001).

A contaminação de milho por *F. verticillioides* ocorre principalmente por meio da infecção dos estigmas por conídios fúngicos carregados pelo ar ou água. No entanto, a doença pode se estabelecer via contaminação da semente chegando à espiga e grãos por meio da circulação sistêmica caulinar; pela infecção da raiz atingindo os grãos através do colmo e espiga; e via ferimentos causados por insetos, os quais, também podem atuar como vetores de inóculo (BORDINI et al., 2013).

Bordini et al. (2013) nos relatam que as fumonisinas são sintetizadas pela via das policetidas durante o metabolismo secundário do fungo, a qual se inicia, frequentemente, após o término da fase de crescimento.

A Fumonisina B<sub>1</sub>, o análogo mais abundantemente encontrado (GALVANO et al., 2002), tem a fórmula empírica C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub> e consiste de diéster de propano-1,2,3-ácido tricarbálico e 2-amino-12,16- dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxi-eicosano (Figura 2), sendo que os grupos hidroxila dos carbonos 14 e 15 encontram-se esterificados com o grupo carboxila terminal do ácido tricarbálico (BEZUIDENHOUT et al., 1998).



**Figura 2:** Estrutura química da Fumonisina B<sub>1</sub>. Disponível em <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>. Acesso em 18/08/2016.

As fumonisinas são moléculas polares e, ao contrário das outras micotoxinas contaminantes de alimentos, não possuem nenhuma estrutura aromática ou cromófora de fácil detecção analítica (MURPHY et al., 2006).

A biossíntese dessas toxinas inicia-se com a formação da cadeia carbônica principal a partir da condensação de uma molécula de acetil-CoA, 8 moléculas de malonil-CoA e duas moléculas de metionina, sob forma de S-adenosil. O produto desta reação, catalisada por uma policetida sintase, é um policetídeo de 18 carbonos o qual é condensado ao aminoácido alanina. Posteriormente, ocorrem subseqüentes oxidações nas posições C-14 e C-15, catalisadas por oxigenases citocromo P450 dependentes; esterificações com propano-1,2,3-ácidos tricarbóxílicos nos grupos hidroxilas dos carbonos 14 e 15, catalisadas por uma aciltransferase, e hidroxilação no C-5 pela ação da dioxigenase 2-ceto-glutarato-dependente (BOJJA et al., 2004).

Os componentes das moléculas de fumonisinas apresentam diferentes origens biogênicas. Os carbonos 3-20 são derivados do acetato, os grupos aminos em C-1 e C-2 da alanina, e os dois grupamentos metil nos carbonos 12 e 16 da metionina. O grupo hidroxila no C-3 é proveniente do grupo carbonila derivado do acetato, enquanto que os grupos hidroxila nos carbonos 5, 10, 14 e 15 são originados do oxigênio molecular. Os ácidos tricarbóxílicos provavelmente são derivados do ácido glutâmico pela via do ciclo do ácido cítrico (CALDAS et al., 1998).

As quatro principais categorias, denominadas de fumonisina A, B, C e P, são compostos por FA<sub>1</sub>, FA<sub>2</sub>, FA<sub>3</sub>, FAK<sub>1</sub>; FB<sub>1</sub>, FB<sub>2</sub>, FB<sub>3</sub>, FB<sub>4</sub>; FC<sub>1</sub>, FC<sub>2</sub>, FC<sub>3</sub>, FC<sub>4</sub>; FP<sub>1</sub>, FP<sub>2</sub> e

FP<sub>3</sub>. Além destes 15 análogos, existem outros metabólitos de menor importância não detectados como contaminantes naturais (MINAMI et al., 2004).

A contaminação de produtos agrícolas por fumonisinas depende de fatores como região geográfica, estação do ano e condições de plantio, colheita e estocagem. Grãos cultivados em regiões subtropicais e tropicais estão mais propensos à contaminação por fumonisinas devido ao período de cultivo relativamente longo e quente, sendo milho e sorgo as culturas que apresentam maior risco de contaminação (BORDINI et al., 2013).

Em geral, para o *F. verticillioides* as condições ótimas de produção de fumonisinas em milho são de atividade de água (aw) de 0,95-0,98, temperatura de 30°C e período de incubação de 4 a 6 semanas (MARÍN et al., 1995).

### 3.2.1 Ocorrência

No Brasil, o primeiro relato sobre a ocorrência natural de fumonisinas em milho foi realizado por Sydenham et al. (1992), que analisaram 21 amostras de rações associadas a surtos confirmados e suspeitos de micotoxicoses em diversas espécies de animais no Estado do Paraná.

A avaliação da contaminação natural por fumonisinas em 39 amostras de milho do Estado do Paraná e 9 dos Estados do Mato Grosso do Sul e de Goiás, revelou 97,4% de positividade para FB<sub>1</sub> e 94,8% para FB<sub>2</sub> (HIROOKA et al., 1996).

Na análise de 150 amostras de milho recém colhido das regiões centro-sul, centro-oeste e norte do Estado do Paraná foram detectadas FB<sub>1</sub> em 100% das amostras (média de 2,39 µg/g) e FB<sub>2</sub> em 97,7% (média de 1,09 µg/g) (ONO et al., 1999).

Na análise de 23 amostras de 19 cultivares de milho do Estado de São Paulo foi detectada 100% de positividade para fumonisinas. As médias de contaminação variaram de 1,63-25,69 µg/g para FB<sub>1</sub> e de 0,38-8,6 µg/g para FB<sub>2</sub> (CAMARGOS et al., 2000).

Westhuizen et al. (2003) analisaram 75 amostras de milho destinadas ao consumo humano, provenientes das regiões Oeste, Norte e Sul do Estado de Santa Catarina; e 15 amostras de milho destinado ao consumo animal da região Sul do Estado, com detecção média de fumonisinas totais (B<sub>1</sub> + B<sub>2</sub> + B<sub>3</sub>) de 3,2, 3,4, 1,7 e 1,5 µg/g, respectivamente.

A análise de amostras de milho (safra de 2003) recém colhidas (n= 100) e de amostras da recepção (n= 200) e da etapa de pré-secagem (n= 90) de indústrias de processamento de milho da região Norte do Estado do Paraná, demonstrou contaminação por FB<sub>1</sub> em todas as etapas avaliadas. Os níveis de contaminação variaram de 0,11-2,68 µg/g nas amostras recém-

colhidas, 0,10- 1,83  $\mu\text{g/g}$  na recepção e 0,02-10,98  $\mu\text{g/g}$  na etapa de pré-secagem. Quanto à contaminação por  $\text{FB}_2$  as concentrações foram de 0,01-5,26  $\mu\text{g/g}$ , 0,02-5,25  $\mu\text{g/g}$  e 0,07-7,89  $\mu\text{g/g}$  respectivamente (ONO et al., 2008).

Ainda dentro desse contexto, Queiroz et al. (2012) detectaram a presença de fumonisinas em 100% das amostras de milho analisadas (n=40), todas provenientes de 10 áreas de agricultura familiar localizadas nas cidades de Esmeraldas, Pedro Leopoldo, Funilândia e Sete Lagoas, Estado de Minas Gerais, em concentrações que variaram de (230 a 6.450  $\mu\text{g/g}$ ). Comparativamente, amostras de milho (n= 63) de diferentes regiões da Croácia apresentaram 90% de positividade para fumonisinas, com uma média de 1.756  $\mu\text{g/g}$ . Como se vê, a problemática parece envolver diferentes áreas ao redor do globo.

Segundo, mais recentemente, Bordini et al. (2013), avaliaram amostras de ração (n=11) associadas a seis casos de intoxicação em cavalos e frangos, e amostras de milho (n= 128) das regiões Norte (safra 1991, 1995, 1997), e Centro-Sul (safra 1995), do Estado do Paraná quanto à contaminação por fumonisinas. Na safra de 1991, todas as amostras de milho (n=27) da região Norte estavam contaminadas com fumonisinas em concentrações de 2,32 a 16,64  $\mu\text{g/g}$ , enquanto que na safra de 1995 houve um decréscimo nos níveis de contaminação (0,57 – 9,97  $\mu\text{g/g}$ ), fato que se repetiu na safra de 1997, na qual 21 das 37 amostras estavam contaminadas com concentrações de 0,05-2,67  $\mu\text{g/g}$ . Nas amostras da região Centro-Sul (n=27) a frequência de contaminação foi de 96,3% com níveis de fumonisinas variando de 0,07-3,66  $\mu\text{g/g}$ .

Dessa forma, em consonância com o arrazoado supradescrito, a contaminação por fumonisinas em diferentes épocas, regiões do país e concentrações estão descritas em alguns estudos. De qualquer forma, perdura a dúvida sobre o tempo de exposição e concentração que chegue à corrente sanguínea de humanos e animais e que possa estar associada à quebra de homeostase dos mesmos.

### **3.3.2 Parâmetros toxicocinéticos**

As fumonisinas possuem uma elevada taxa de eliminação biliar e baixa absorção por via oral. De fato, Shephard et al. (1994), utilizando ratos como modelo experimental, demonstraram que dentro de 4 horas após a administração de 7,5mg/kg de peso corporal (BW)  $\text{FB}_1$  intraperitoneal a ratos, recuperou-se cerca de 67% da dose na forma inalterada de  $\text{FB}_1$  na bile. Em contraste, apenas 0,2% do biomarcador foi recuperado na bÍlis após

administração oral da mesma dose o que suportou, no modelo utilizado, duas importantes características toxicocinéticas da FB<sub>1</sub>.

Esses achados foram corroborados por Voss et al. (2001), que ao administrar FB<sub>1</sub> em ratos pelas vias intraperitoneal e intravenosa, observaram acúmulo da micotoxina nos rins e fígado, com percentual médio de detecção de 66% do marcador radioativo nas fezes, sugerindo fortemente a excreção de FB<sub>1</sub> ou metabolito(s) pela via biliar.

Contudo, se for atentado à quantidade de parâmetros toxicocinéticos possíveis de serem estudados, existe um montante muito reduzido e limitante ao que tange fumonisinas. Entretanto, embora já se tenha transcorrido algum tempo, ainda são aceitos alguns desses dados levantados por Shephard et al. (1994) em roedores (ratos), como o tempo de concentração plasmática máximo (T<sub>max</sub>), que é de cerca de 20 minutos; o pico de concentração plasmática, que é de 8,6µg/mL; e uma meia-vida eliminação (T<sub>1/2</sub>) de cerca de 18 minutos.

### 3.4 OS ESFINGOLIPÍDEOS

Em 1884, Johann Ludwig Wilhelm Thudichum nomeou os esfingolipídeos, originalmente fazendo referência à sua natureza enigmática o qual, passou grande parte de seu tempo livre pensando sobre a esfinge da mitologia Grega, e assim chamou os compostos que havia isolado. A base esfingóide termo genérico, refere-se à cadeia alifática 2-amino-1,3-dióis (SORIANO et. al., 2005).

Os esfingolipídeos são cruciais para a manutenção da estrutura lipoprotéica das membranas, comunicação celular, interação entre células e matriz extracelular, modulação dos receptores de fatores de crescimento e atuam como segundos mensageiros nas vias de sinalização, mediando o crescimento celular, diferenciação e morte celular. Também servem como sítios de ligação para proteínas da matriz extracelular, inclusive para determinados microrganismos e toxinas microbianas (MINAMI et. al., 2004).

Eles são um segundo tipo de lipídios nas membranas das células, particularmente células nervosas e os tecidos cerebrais, mas não exclusivamente. Eles não contêm glicerol, mas retêm os dois álcoois com a posição do meio ocupado por uma amina. Os esfingolipídeos incluem esfingomielinas e glicosfingolipídeos (cerebrosídeos, sulfatídeos, globosídeos e gangliosídeos). Na esfingomielina, a base esfingosina tem vários outros grupos ligados, um ácido graxo ligado à amina por meio de uma ligação amida, fosfato ligado através de uma ligação éster de fosfato, e de novo, através de uma ligação éster de fosfato, a colina. As

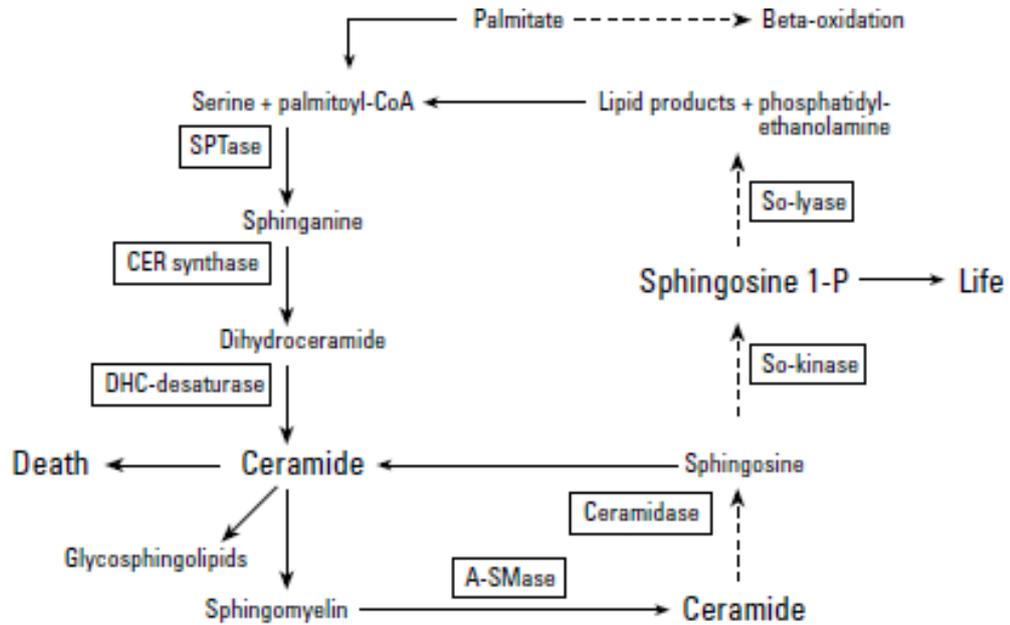
esfingomielinas estão localizadas em todo o corpo das membranas das células nervosas, e correspondem cerca de 25% dos lipídeos na bainha de mielina, a qual envolve e isola as células do sistema nervoso central, para permitir a rápida condução de sinais elétricos (SORIANO et. al., 2005).

Os diferentes intermediários dos esfingolípídeos possuem vários efeitos sobre os processos celulares. Um deles, a esfingosina (So), é constituída por três partes, três cadeias de carbono com dois álcoois, uma amina ligada e um hidrocarboneto de cadeia longa. Ela desempenha um papel na regulação do crescimento celular, diferenciação celular, na morfologia das células, na apoptose e na permeabilidade de células endoteliais (MERRIL et. al., 2001).

Um importante glicosfingolípídeo, a ceramida, desempenha um papel na regulação e diferenciação de células, apoptose e secreção de proteínas, indução de senescência celular e outros processos. Os efeitos finais são dependentes da concentração e também do tipo de célula. Outra característica das bases esfingóides (esfinganinas, esfingosinas) é a inibição de transformação celular (MERRIL et. al., 2001).

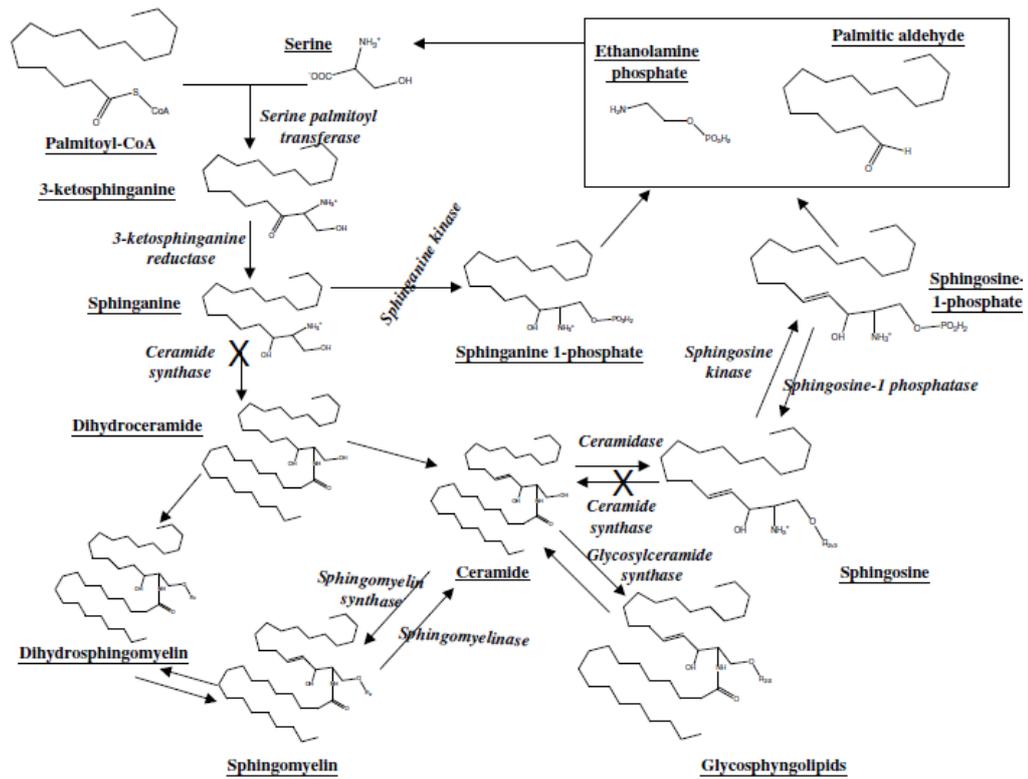
A esfingosina (So) é a base esfingóide prevalente dos esfingolípídeos de mamíferos e muitas vezes é utilizada como um termo genérico para todas as bases esfingóides, contudo, a esfingosina mais frequente refere-se especificamente à D-eritro-1,3-diidroxi-2- amino-octadec-4-eno ou 4-trans-esfinganina (MINAMI et al., 2004).

A biossíntese dos esfingolípídeos complexos ocorre na face citosólica do retículo endoplasmático e inicia-se com a condensação de uma L-serina e um palmitoil-CoA, pela ação da enzima, piridoxal-dependente, serina palmitoiltransferase. O produto desta reação é a 3-ceto-esfinganina que, ao ser reduzida, é convertida à esfinganina (dihidroesfingosina). Esta, por sua vez, pode ser fosforilada originando esfinganina 1-fosfato ou N-acilada, pela ação da ceramida sintase, formando uma diidroceramida, que é então dessaturada à ceramida (Figura 3) (BORDINI et al., 2013).



**Figura 3:** Via de biossíntese dos esfingolípideos e rotatividade em uma célula de mamífero. Adaptado de Bordini et al. (2013).

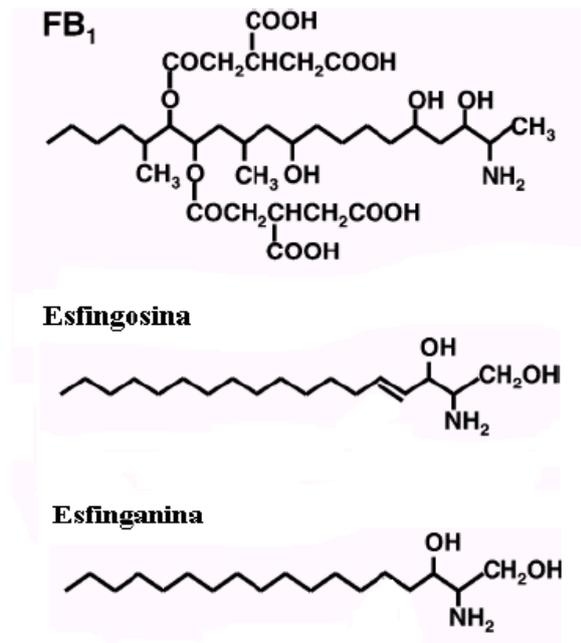
A ceramida pode originar a esfingomielina, pela adição de uma fosfocolina; os glicosfingolípídios, pela complexação com oligossacarídeos; ou esfingosina, por meio da ação catalítica da ceramidase. A fosforilação da esfingosina, pela ação da esfingosina quinase, origina esfingosina-1-fosfato, a qual, juntamente com a esfinganina-1-fosfato, pode ser catabolizada à etanolamina fosfato e aldeído graxo. Estes podem ser utilizados como substratos para regeneração da L-serina e do palmitoil-CoA (Figura 4) (SORIANO et al., 2005).



**Figura 4:** Resumo da biossíntese dos esfingolípdeos em uma célula animal. O símbolo X indica a via enzimática inibida pela fumonisina B<sub>1</sub>. Adaptado de Bordini et al. (2013).

### 3.5 TOXICIDADE DA FB<sub>1</sub>

As fumonisinas são estruturalmente semelhantes às bases esfingóides, tais como a esfingosina, como nos mostra a figura 5 e são capazes de inibir a ceramida sintase. Os estudos sobre a toxicologia das fumonisinas estão dirigidos para FB<sub>1</sub>, o principal análogo produzido por *F. verticillioides* tanto em meios de cultura quanto em milho e produtos derivados (MINAMI et al., 2004).



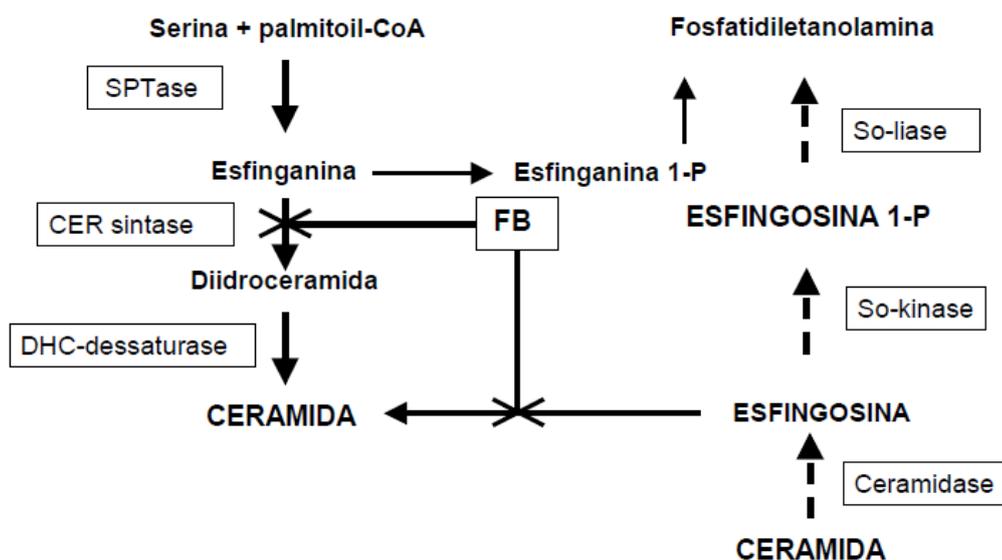
**Figura 5:** Estrutura da fumonisina B<sub>1</sub> e das bases esfingóide. Adaptado Minami et al., 2004.

O grupo amino livre parece desempenhar um papel específico na atividade biológica de FB<sub>1</sub>, de forma que há redução na toxicidade de fumonisinas. Merrill et al. (1996) relataram em seus estudos que, na presença de FA<sub>1</sub>, que ocorre uma redução da atividade da ceramida sintase em aproximadamente 2%, o que fora suficiente para que observassem uma diminuição da toxicidade de FB<sub>1</sub> *in vitro*, mesmo em uma dose de 10μM.

Outro estudo, conduzido por Soriano et al. (2005), demonstrou que a FA<sub>1</sub> foi menos citotóxica que a FB<sub>1</sub>. Estes resultados suportam a necessidade de um grupo amino primário no sentido de aumentar sua toxicidade e a inibição da ceramida sintase por fumonisinas.

### 3.5.1 Mecanismo de ação dos esfingolípídeos e seus metabólitos na toxicidade da FB<sub>1</sub>

Como mencionado anteriormente, os efeitos tóxicos causados por meio da ingestão de alimentos ou rações contaminados por fumonisinas estão relacionados à sua estrutura, semelhantes aos esfingolípídeos (esfinganina e esfingosina). Devido a essa semelhança, as fumonisinas inibem competitivamente a ceramida sintase (esfingosina e esfinganina N-acetiltransferase), enzima chave na biossíntese e degradação de esfingolípídeos, sendo inibida por todas as fumonisinas que possuem o grupamento amino livre no C-2 por meio de interações não covalentes (Figura 6) (BORDINI et al., 2013).



**Figura 6.** Locais de ação da fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) no metabolismo de esfingolípídeos. O símbolo X indica a via enzimática inibida pela Fumonisina B<sub>1</sub>. Abreviaturas: SPTase (serina palmitoiltransferase, CER sintase (ceramida sintase), DHC-dessaturase (dihidroceramida dessaturase), So-kinase e -liase (esfingosina quinase e liase). Adaptado de Bordini et al. (2013).

No entanto, segundo Soriano et al. (2005), as fumonisinas são inibidores competitivos em relação a ambos os substratos (isto é, esfinganina e acil coenzima A) da esfinganina (esfingosina) N-acetiltransferase (ceramida sintase). Com isso, tem-se duas consequências: bloqueio dos complexos da biossíntese dos esfingolípídeos e acúmulo de esfinganina. Com isso, o mecanismo de ação decorre da inibição da biossíntese de ceramida, com consequente aumento de esfinganina e esfingosina livre, assim como pela redução na reacilação da esfingosina e da degradação dos esfingolípídeos provenientes da dieta.

Esses eventos metabólicos induzidos pela FB<sub>1</sub> refletem no controle da apoptose, na, carcinogenicidade e envolvimento da peroxidação lipídica (SORIANO et al., 2005).

#### **a. Estudos em animais**

Segundo Riley et al. (2001), os mecanismos sobre os quais a fumonisina atua causando toxicidade ainda não estão totalmente elucidados. Com base nas evidências de que essas micotoxinas alteram o metabolismo dos esfingolipídios, estão intimamente associadas com a toxicidade hepática e renal observada em roedores e animais.

Em equinos, o aumento de bases esfingóides livres no soro, fígado e rim e diminuição de esfingolipídeos no fígado e no rim, estão presentes mesmo antes de indicações de hepatotoxicidade clínica.

Em suínos, o aumento dose-dependente em bases esfingóides livres no soro e no fígado e a diminuição de esfingolipídeos complexos no fígado, os quais são correlacionados com hepatotoxicidade; bem como o aumento em esfingóides livres no fígado, rim, pulmão precedem ao aparecimento de hepatotoxicidade e edema pulmonar.

Já em ratos, a concentração de base esfingóide livre no soro, urina, fígado, rim e esfingolipídeos complexos no fígado e rins são correlacionados com a extensão e a gravidade da hepatotoxicidade e/ou nefrotoxicidade ou outros indicadores de citotoxicidade.

Por fim, em camundongos, a concentração de base esfingóide livre no fígado e no rim está correlacionada com um aumento da apoptose e necrose no fígado e no rim.

Também, segundo Riley et al. (2001), numerosos estudos conduzem à hipótese de mudanças induzidas pelas fumonisinas em enzimas-chave, envolvidas na regulação do ciclo celular, diferenciação e/ou apoptose como sítios iniciais ou secundárias de ação, tais como: Alteração da expressão ou atividade da proteína quinase C, alteração da ligação dibutirato de forbol; Ativação da proteína quinase mitógena-ativada; Inibição da serina/treonina fosfatases; Alteração da expressão de ciclinas, quinases dependentes de ciclina, e desfosforilação da proteína do retinoblastoma; Sobre-expressão da transformação crescente do fator- $\beta$ 1 e c-myc em fígado de ratos; e inibição da apoptose e inibição da proteção da protease da apoptose.

Outrossim, o mesmo trabalho aponta que alterações nos processos frequentemente associados com o aumento da toxicidade célula/órgão parecem ser dependentes do aumento do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), secreção em macrófagos ativado por lipopolissacarídeo; Alteração da homeostase do cálcio; Alterações em antioxidantes, aumento da peroxidação lipídica, alterações na saturação de ácidos graxos e outras alterações lipídicas; e estimulação da produção de óxido nítrico.

O bloqueio do metabolismo dos esfingolípídeos é o passo inicial ou o evento principal, intimamente relacionado com o início e progressão das doenças associadas com fumonisinas em equinos, suínos e roedores. Também está associada com alterações na proliferação celular e morte celular em culturas de células primárias e algumas linhagens de células (BAILLY et al., 2001).

A completa inibição da ceramida sintase causa uma elevação rápida da concentração intracelular de Sa (Esfinganina), e depleção dos esfingolípídeos complexos nas células. Entretanto, a magnitude destas respostas depende de muitos fatores, como a taxa de *turnover* dos esfingolípídeos e crescimento celular (MERRIL et al., 2001).

Estima-se que as fumonisinas também atuem nos sítios de regulação celular, aparentemente independente do bloqueio do metabolismo dos esfingolípídeos, alterando a proliferação e a comunicação celular, adesão, apoptose, indução de estresse oxidativo e modulação de expressão gênica (MOBIO et al., 2000).

Os intermediários na biossíntese dos esfingolípídeos também são compostos altamente bioativos, sendo mantidos em baixas concentrações sob condições normais. Sa e So (esfingosina) estão normalmente presentes em concentrações mínimas nos tecidos, porém o nível de Sa livre é sempre menor que o de So livre (RILEY et al., 1993).

Segundo Minami et al (2004), a inibição da ceramida sintase resulta em um aumento dos níveis de Sa nas células, e algumas vezes de níveis de So, resultando na elevação da relação Sa:So, tanto no sangue quanto na urina de ratos, camundongos, coelhos, porcos, macacos, e parece ser o indicador mais sensível de exposição a fumonisinas.

O acúmulo de Sa biossintetizada é um marcador bioquímico precoce em resposta ao tratamento com FB<sub>1</sub> em doses abaixo daquelas que produzem evidências morfológicas de lesão (1mg/Kg), sendo que o aumento de Sa livre nos tecidos ocorre antes de danos evidentes serem detectados nos órgãos alvo. Em hepatócitos tratados com FB<sub>1</sub>, uma parte de Sa acumulada é metabolizada a esfinganina 1-fosfato seguida de clivagem a aldeído graxo e fosfato de etanolamina, sendo que ambos, podem ser redirecionados a outras vias metabólicas. A capacidade das células de metabolizar rapidamente as bases esfingóide livres a produtos menos bioativos podem protegê-las das toxicidades, associadas tanto com a elevação das bases esfingóides livres quanto das ceramidas (RILEY et al., 2001).

Merril et al. (2001) constataram que além do acúmulo de Sa livre, a inibição da ceramida sintase altera outros lipídeos com importantes funções celulares. A exposição à fumonisinas leva a um desequilíbrio no metabolismo dos fosfoglicerolípídeos e de ácidos graxos, alteração da expressão de citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

Embora as fumonisinas tenham sido descobertas em 1988, a toxicidade do milho contaminado por *F. verticillioides* denominada de “envenenamento por milho mofado” foi documentada há mais de um século em equinos e descrita pela primeira vez em 1850 nos Estados Unidos (MINAMI et al., 2004).

A manifestação mais grave de envenenamento por milho mofado é a leucoencefalomalácia (LEM), uma doença cerebral fatal em cavalos, burros, mulas e coelhos. Os sintomas da LEM incluem ataxia, parestesia, apatia, hipersensibilidade, debilidade da função motora, necrose da substância branca cerebral e lesões no córtex cerebral, resultando em morte dentro de poucas horas a uma semana. Além de lesões cerebrais, foram relatadas anormalidades histopatológicas no fígado e rim em cavalos que ingeriram fumonisina pura, milho naturalmente contaminado ou material de cultura de *F. verticillioides* (WANG et al., 1991).

Em suínos, a principal manifestação de toxicidade das fumonisinas foi o edema pulmonar (PPE), potencialmente fatal, registrado após consumo de milhos contaminados com *F. verticillioides*, provenientes da safra de grãos de 1989 em Iowa, Illinois e Georgia nos Estados Unidos (MARASAS, 2001).

A doença tem sido reproduzida experimentalmente pelo fornecimento de grãos contaminados com *F. verticillioides*, material de cultura e pela administração intravenosa de FB<sub>1</sub> pura. A patogênese do edema pulmonar se deve a danos ao endotélio pulmonar, danos ao epitélio alveolar e falência cardíaca (GUMPRECHT et al., 2001), conduzindo a óbito dentro de 4-7 dias de ingestão diária de fumonisinas em concentrações maiores ou iguais a 92 µg/g ou 6 mg/Kg de peso corporal/dia (RILEY et al., 2001).

A elevação do colesterol sérico parece ser uma outra característica constante da condição e enzimas hepáticas também podem estar aumentadas. Além disso, observam-se alterações nos sistemas hepático, cardiovascular e imune (D’MELLO et al., 1997).

Estudos comparativos da toxicidade das fumonisinas em diferentes animais levaram a concluir que o principal órgão alvo difere em cada espécie. Contudo certos órgãos, incluindo o fígado e o rim, parecem ser afetados de forma constante em maior ou menor extensão, sendo hepatotóxica em todos os animais testados (ratos, camundongos, coelhos, macacos, porcos e cavalos) e nefrotóxica em ratos, coelhos, porcos e camundongos (VOSS et al., 2001).

### 3.6 CICLO CELULAR

A molécula do ácido desoxirribonucleico, o DNA, é constituída por duas cadeias helicoidais polimerizadas de nucleotídeos que se enrolam ao redor de um mesmo eixo longitudinal, formando uma dupla hélice. Os nucleotídeos são constituídos por bases nitrogenadas associadas às moléculas de ribose e fosfato através de ligações fosfodiéster. As desoxirriboses ficam no plano externo em relação às bases nitrogenadas, expostas ao meio aquoso. O espaço entre uma fita e outra forma um sulco que é ligado por pareamento de bases nitrogenadas através de pontes de hidrogênio (MARZZOCO, 1999).

Em uma extremidade da fita do DNA está livre a hidroxila do carbono-5 da primeira pentose e na outra está livre a hidroxila do carbono-3 da última pentose. Já na fita complementar este sentido é invertido. Durante a duplicação do DNA, fundamental para a divisão celular (mitose e meiose), a DNA polimerase, a qual é a principal enzima envolvida, sintetiza as fitas de DNA no sentido 5'-3', produzindo fitas complementares.

A direção da biossíntese da nova fita de DNA e o fato das duas fitas moldes correrem em sentido antiparalelo vem de encontro com a necessidade de uma fita molde e de um primer. A DNA polimerase somente consegue sintetizar uma nova molécula de DNA acrescentando novos nucleotídeos ao carbono 3' do glicídeo (o carbono 5' fica localizado na parte oposta a esse glicídeo). Por isso se diz que a biossíntese dos ácidos nucleicos ocorre no sentido 5' → 3'. Como cada fita da molécula de DNA corre em sentido inverso, a sua duplicação ocorre em direções opostas (MARZZOCO, 1999; SILVA *et al.*, 2003).

As bases nitrogenadas são divididas em dois grupos de acordo com a figura 7: as purinas e as pirimidinas. As derivadas das purinas são a adenina (A) e a guanina (G), e as derivadas das pirimidinas são a citosina (C) e a timina (T). O pareamento das bases de cada fita se dá de maneira específica, de forma que uma purina sempre seja pareada com uma pirimidina, especificamente: adenina (A) com timina (T) e citosina (C) com guanina (G). A dupla hélice de DNA é, portanto, mantida basicamente por duas forças: as pontes de hidrogênio formadas entre as bases complementares e por interações hidrofóbicas (SILVA *et al.*, 2003).

A reprodução celular eucariótica é dependente da linhagem celular e pode se dar por meiose ou mitose. Nessa última, se considera duas etapas essenciais, a intérfase e a mitose em si. A intérfase é a fase que a célula se prepara para a mitose. Ainda que a mitose constitua a etapa determinante para a conclusão do ciclo celular, é na intérfase que ocorre a duplicação do

DNA. Quando desenvolvidas todas as etapas, a célula finalmente pode concluir seu ciclo ou sua proliferação (YOUNG; HEALTH, 2001).

A proliferação celular, por sua vez, compreende uma coordenação de eventos bioquímicos complexos e precisos que estão contidos em etapas extremamente coordenadas e reguladas, que sinalizam o andamento e as passagens entre G1, S, G2 e M. Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenação dos processos de diferenciação, senescência e morte celulares (MALUMBES e BARBACID, 2009).

O mau funcionamento nessas vias leva ao aparecimento e perpetuação de mutações e aberrações cromossômicas que favorecem ao aparecimento de diversas patologias, entre elas o câncer (MALUMBES e BARBACID, 2009).

A fase G1 da intérfase compreende a preparação da célula para a biossíntese do DNA que ocorre na fase S. Em seguida, a célula entra na fase G2, que corresponde à preparação para entrada em mitose. Quando as células estão em período de não proliferação, considera-se que elas estão na fase G0 do ciclo, correspondente a um período de quiescência, onde o DNA encontra-se metilado impedindo o acesso da maquinaria de transcrição e, conseqüentemente, bloqueando a transcrição gênica (SCHAFER, 1998; VERMEULEN et al., 2003; KLOSE & BIRD, 2006).

### 3.7 GENOTOXICIDADE

Os agentes genotóxicos podem ser definidos funcionalmente por possuírem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Desta forma, as medidas de genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, et al., 2013).

Os ensaios de genotoxicidade *in vitro* são ferramentas sensíveis para a detecção da genotoxicidade e da potencial carcinogenicidade de agentes microbiológicos, químicos ou físicos (HARTMANN, 2002).

A molécula de DNA pode ser alvo de xenobióticos metabólicos que reagem diretamente, ou indiretamente, com a incorporação de nucleotídeos análogos, ou bloqueando funções metabólicas do DNA como, por exemplo, as topoisomerases e as DNA polimerases. Duas estratégias estão envolvidas nas respostas aos danos ao DNA: os danos são reparados ou tolerados, ou as células são removidas por apoptose. Aqui não levamos em consideração a possibilidade de necrose, a qual não adentra no campo da reparação, portanto, não há

possibilidade de que os processos apoptóticos se estabeleçam neste caso. O não reparo no caso de a célula manter-se viável, por sua vez, leva a consequências tais como as aberrações cromossômicas, mutações em genes e transformações que concorrem à malignidade imposta às células dos tecidos (KULTZ, 2005).

Os testes de genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* são ferramentas sensíveis para detecção da ação lesiva ao material genético e do potencial carcinogênico de várias moléculas (MALUF; ERDTMANN, 2003). Estudos que envolvem a genotoxicidade incluem, principalmente, danos no DNA, mutações e aberrações cromossômicas (COMBES, 1992; CHOY, 2001).

Destarte ao potencial carcinogênico, os estudos genotóxicos também encontram amparo na elucidação mecanística dos fenômenos relacionados a doenças congênitas, doenças genéticas (mutagênese) degenerativas e envelhecimento celular (ERDTMANN, 2003).

Tendo esses pressupostos como base, os estudos genotóxicos ganham notoriedade em sua relação com a segurança de uso de drogas, fármacos, insumos farmacêuticos, contaminantes ambientais antropogênicos em geral, entre outros, principalmente quando os mesmos são utilizados ou protagonizam uma perspectiva de uso ou exposição prolongados (POWERS *et al.*, 1995; HOVHANNISYAN, 2010; LIU *et al.*, 2012).

Muitos dos agentes genotóxicos interagem quimicamente com o material genético, gerando alteração oxidativa ou mesmo quebras na molécula de DNA. Funcionalmente, tais agentes possuem a habilidade de alterar a replicação do DNA e a transmissão genética. Na grande maioria dos casos, a lesão é reparada pelo próprio organismo ou a célula é eliminada. Dependendo do agente causador dos danos, diferentes caminhos de reparo estão envolvidos, tais como o reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de bases (BER), reparo por recombinação não homóloga (NHEJ), recombinação homóloga (HRR), reparo de crosslink (FANC) e anelamento de fitas simples (NATARAJAN; PALITTI, 2008).

O reparo pela via NER está relacionado à presença de *crosslinks* entre as fitas do DNA ou qualquer tipo de lesão que induza distorções na molécula de DNA. De uma maneira geral, o reparo por essa via apresenta os seguintes passos: (1) reconhecimento da lesão no DNA; (2) recrutamento do complexo de reparo; (3) preparação do DNA para o reparo pela ação de helicases; (4) incisão na fita danificada, de cada lado da lesão, com a liberação do fragmento danificado com cerca de 24-32 nucleotídeos; (5) preenchimento do *gap*; (6) ligação do novo fragmento sintetizado (ligação fosfodiéster) (DRABLOS *et al.*, 2004).

As mutações ocorridas nas bases do DNA são também reparadas pelo mecanismo BER (*base nucleotide excision* ou excisão de base de nucleotídeos) que inclui: (1) excisão da

base danificada; (2) incisão no esqueleto do DNA no sítio apurínico ou apirimídico AP; (3) remoção da extremidade AP; (4) preenchimento do *gap* formado; e (5) ligação da nova fita biossintetizada. Em células de mamíferos, o BER é a principal via de reparo que atua contra danos de fita simples causados por agentes metilantes, oxidantes e outros agentes genotóxicos, além de um grande número (cerca de 10.000 por célula por dia) de depurinações espontâneas (WILSON *et al.*, 2003).

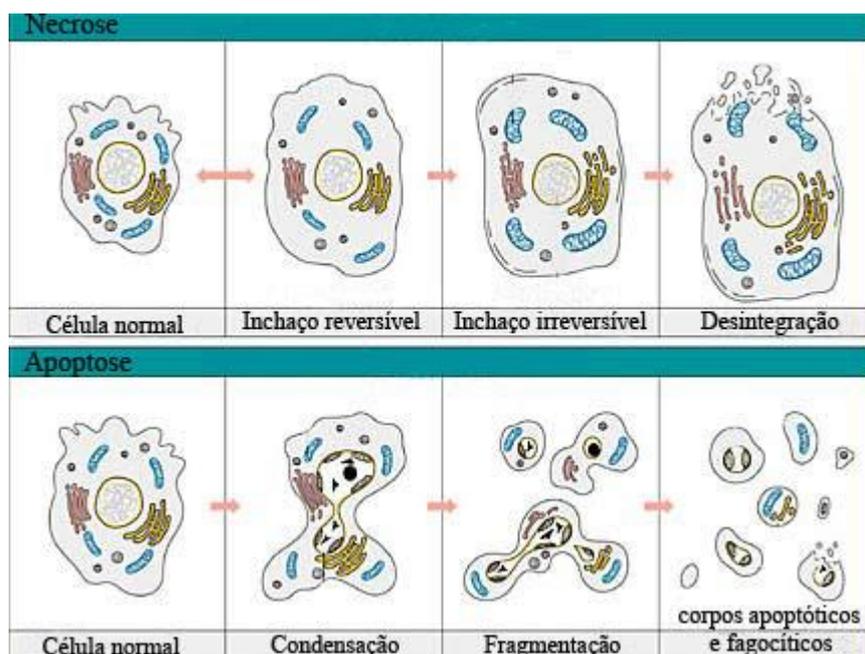
Caso essa lesão seja fixada, provocando alterações hereditárias (mutações), que podem se perpetuar nas células filhas durante o processo de replicação, o agente é denominado mutagênico (CAPELA, 2001; NASCIMENTO, 2001).

Existem duas vias principais de morte celular: a necrose e a apoptose, ambas desencadeadas por agressões intracelulares ou extracelulares. O processo de necrose ocorre principalmente devido às perturbações externas e não fisiológicas, enquanto que o processo de apoptose pode ocorrer através das vias extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A necrose, que é caracterizada por inchaço das células e perda da integridade da membrana celular, é desencadeada por múltiplos estresses, tais como choque osmótico, hipotermia, hipóxia e lesões mecânicas ou químicas (BORODA *et al.* (2016).

Por outro lado, o padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas à morte celular programada, ou apoptose, em alguns processos patológicos *in vivo* inclui: formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica, despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolípidios da membrana plasmática (ANAZETTI; MELO 2007).

A figura 7 representa o esquema da morfologia celular em processos de necrose (em cima) e apoptose (em baixo) (ANAZETTI; MELO 2007). No processo de morte celular por necrose ocorrem alterações da função mitocondrial, diminuindo drasticamente a produção de ATP (adenosina trifosfato) e interferindo na função da bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o que conduz à tumefação celular devido ao aumento de  $\text{Na}^+$  presente no citoplasma. O aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma provoca a ativação de fosfolipases e de proteases que, juntamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio, induzem ruptura da membrana plasmática e ativam as proteases, com conseqüente indução do extravasamento do conteúdo celular, sinalizando, deste modo, a migração de macrófagos e ativando uma resposta inflamatória do sistema imune (ANAZETTI; MELO 2007).



**Figura 7:** Diferenças morfológicas da necrose e apoptose. Adaptado de Anazanetti e Melo (2007).

Ao contrário da retração celular observada em células apoptóticas, na necrose observa-se um edema celular devido às lesões no citoesqueleto e inibição da bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , o que origina a perda da permeabilidade seletiva da membrana. Em contraste, o processo apoptótico envolve a participação ativa das células afetadas na cascata de autodestruição que culmina em degradação do DNA pela via de ativação de endonucleases, desintegração nuclear e formação de corpos apoptóticos. Estes são rapidamente retirados do tecido por macrófagos, sendo que esta sinalização ocorre devido à translocação da fosfatidilserina do lado interno para o lado externo da membrana “assinalando” as células que deverão ser fagocitadas (ANAZETTI; MELO 2007).

Já a apoptose é caracterizada como um processo ativo fundamentado pela autodigestão controlada dos constituintes celulares, devido à ativação de proteases intracelulares e endonucleases. A ativação dessas proteases compromete a integridade do citoesqueleto, provocando verdadeiro colapso da estrutura celular. Em resposta à contração do volume citoplasmático, a membrana celular forma bolhas e acaba por comprometer a conformação de seus lipídeos e, por extensão, da fisiologia membranocelular (PAROLIN; REASON, 2001).

Um dos aspectos que distingue a apoptose da necrose é a preservação da integridade da membrana plasmática na primeira, que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular e, conseqüentemente, a modulação da intensidade da resposta de quimiotaxia e de ativação de células fagocíticas. No entanto, algumas vezes, a apoptose e a

necrose coexistem; além disso, a apoptose induzida por alguns estímulos patológicos pode progredir para a necrose (PAROLIN; REASON, 2001).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A obtenção da matriz biológica em estudo, ou seja, leucócitos humanos para realização das culturas e, por extensão, para os protocolos utilizados neste trabalho, foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pampa, sob o número 27045614.0.0000.5323.

### 4.1 SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

O micotoxina Fumonisina B<sub>1</sub> utilizada foi obtida através de doação do Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas e Micotoxinas (LaRPeM) da Universidade Federal do Pampa, campus Itaquí/RS, através do prof. Flávio Ferreira.

Todos os outros reagentes utilizados foram adquiridos da SIGMA-Aldrich.

### 4.2 PREPARO DA CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS

As culturas de leucócitos foram preparadas utilizando 1 mL de sangue venoso coletado por venopunção de voluntário adulto jovem, maior de 18 anos não usuário de medicação. Os linfócitos, obtidos através de gradiente de centrifugação, foram imediatamente transferidos para o meio de cultura contendo 9 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina, conforme descrito em trabalho prévio do nosso grupo (SANTOS MONTAGNER et al., 2010). Os frascos de cultura celular foram colocados em estufa a 37°C por 72 horas. O controle negativo foi preparado utilizando tampão PBS 7,4 e o controle positivo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 mM.

As concentrações testadas foram de 200; 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 µg/mL e 300; 30; 3; 1; 0,1; 0,01 fg/mL correspondentes à micotoxina Fumonisina B<sub>1</sub>. Todos os grupos foram ensaiados em triplicata.

### 4.3 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CITOTÓXICO E GENOTÓXICO EM CULTURA DE LEUCÓCITOS HUMANOS

A técnica escolhida para avaliar a citotoxicidade foi à viabilidade celular, enquanto que o parâmetro genotóxico foi avaliado através da proliferação celular.

### 4.3.1. Viabilidade celular

A viabilidade foi avaliada através da perda da integridade da membrana leucocitária utilizando 100 µL de azul de Tripam e 100 µL da amostra (BUROW et al., 1998). Nesta técnica, as amostras provenientes das culturas de linfócitos foram submetidas ao reativo de Tripam e, após três minutos, uma alíquota foi colocada em uma câmara de Neubauer e visualizada em microscópio no aumento de 400X. A diferenciação entre as células vivas e mortas foi observada através da coloração azul no citoplasma das células inviáveis. Um total de 300 células foi contabilizado por alíquota analisada em lâmina.

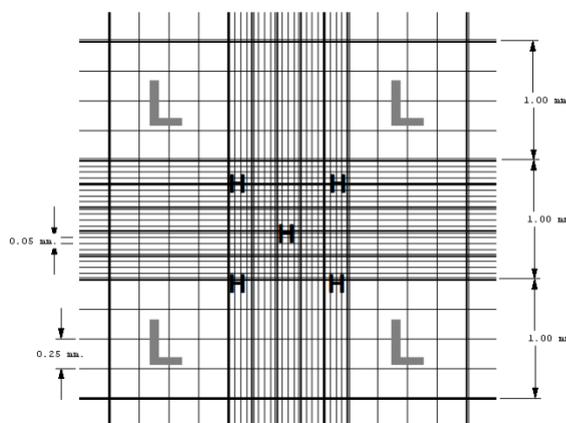
### 4.3.2 Proliferação celular

Em um microtubo foi adicionado 90 µL de solução de Türk e 10 µL da amostra homogeneizada. Após, a câmara de Neubauer foi preenchida com esta suspensão e a contagem dos leucócitos foi realizada nos campos assinalados com a letra “L” conforme a figura 8.

A fórmula utilizada foi:

$$\text{Número total de leucócitos/mL} = \text{número de células contadas} \times 10^4 \times \text{diluição} / 4$$

(número de quadrados)



**Figura 8:** Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. Imagem disponível em:

<http://www.fmvz.unesp.br/takahira/PDFs/T%C3%A9cnicas%20especializa%C3%A7%C3%A3o.pdf>. Acesso em 24/08/2016.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados provenientes dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas utilizando análise de variância (ANOVA) de uma via. Ambos tratamentos estatísticos foram complementados com o teste de Tukey para múltiplas comparações. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CITOTOXICIDADE

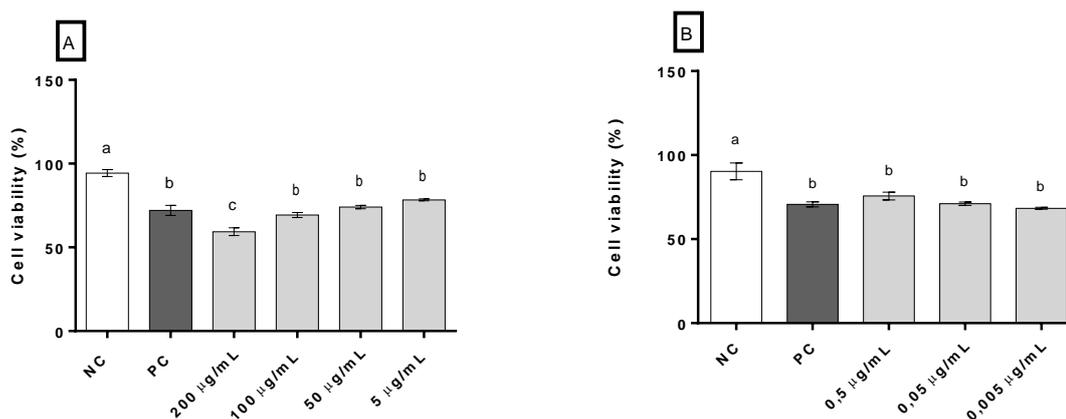
Sabe-se que linhagens celulares quando mantidas em cultura dividem-se e multiplicam-se continuamente. A base dos ensaios de citotoxicidade está exatamente na avaliação da interferência induzida por agentes químicos nos processos metabólicos celulares e na investigação a respeito da maneira em que esses processos possam intervir no crescimento/multiplicação celular, ou até mesmo culminar na morte celular, reduzindo, assim, o número de células viáveis se comparado com culturas controles não-tratadas. Estes ensaios tendem a simplificar os eventos quantificados, contudo, por serem métodos simples, de baixo custo e reprodutíveis, são extensamente empregados em processos de triagem (FRESHNEY, 1994).

Os resultados obtidos a partir do ensaio de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos às diferentes concentrações de Fumonisina B<sub>1</sub> demonstraram que essa micotoxina é capaz de induzir citotoxicidade em baixas concentrações, considerando as condições experimentais aqui ensaiadas.

Na figura 9 A, o controle negativo apresentou um percentual de células viáveis de 94,33%, enquanto o controle positivo apresentou um percentual de 72%, com uma redução de 23,67% em relação ao controle negativo ( $p < 0,0001$ ).

As diferentes concentrações testadas (200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL) apresentaram, respectivamente, uma viabilidade celular de 59,33%, 69,33%, 74% e 78,33%, com uma diminuição dos percentuais de viabilidade celular entre 16,96 a 37,10% ao comparar-se com o controle negativo. Não obstante, a maior concentração testada da micotoxina (200 µg/mL) apresentou citotoxicidade maior que a encontrada para o controle positivo ( $p < 0,0001$ ).

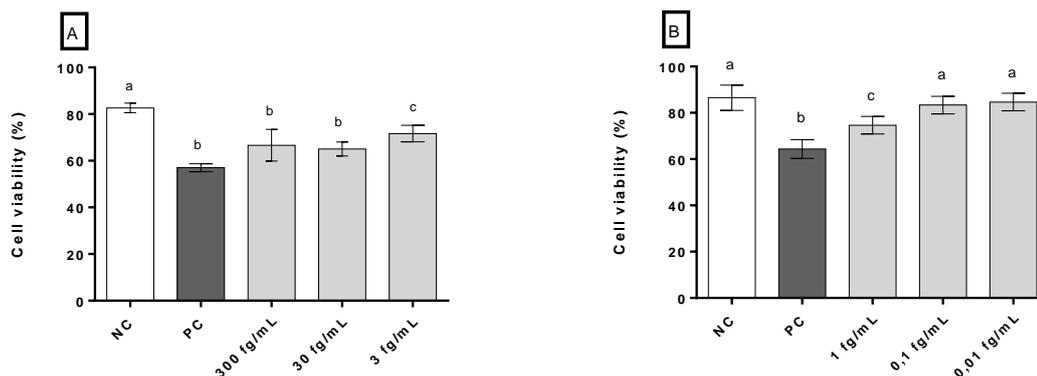
Ao analisar a viabilidade celular dos leucócitos humanos submetidos a uma nova curva de concentração, a saber, 0,5 µg/mL, 0,05 µg/mL e 0,005 µg/mL, o controle negativo apresentou um percentual de células viáveis de 90,33%, enquanto o controle positivo demonstrou uma redução aproximada de 21,77% em relação ao controle negativo, com um percentual de 70,66% de células viáveis (Figura 9 B). As diferentes concentrações testadas apresentaram, respectivamente, uma viabilidade de 68,33%, 71% e 75,67%, que se assemelham à viabilidade encontrada para o controle positivo, com um percentual de redução de 16,22 a 24,36% quando comparadas ao controle negativo ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 9 A-B:** Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B<sub>1</sub>. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, n=3; p<0.0001. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; NC=controle negativo; PC=controle positivo.

Na figura 10-A, o controle negativo apresentou um percentual de células viáveis de 82,67%, enquanto o controle positivo demonstrou uma redução aproximada de 31,05%, em relação ao controle negativo, com um percentual de 57% de células viáveis. As diferentes concentrações testadas, 300 fg/mL, 30 fg/mL e 3 fg/mL, apresentaram, respectivamente, uma viabilidade de 66,67%, 65% e 71,67%, com uma faixa de redução de 13,30 a 21,37% em relação ao controle negativo (p<0,05). Todavia, importante salientar que a concentração de 3 fg/mL, apesar de ter apresentado um percentual de células viáveis menor que o controle negativo, demonstrou ser menos citotóxica que as maiores concentrações de FB<sub>1</sub> testadas, apresentando um percentual de viabilidade maior que o controle positivo (p<0,01).

Pelo fato de a curva de viabilidade testada ainda ter induzido diminuição da viabilidade de leucócitos humanos semelhantes ao controle positivo, foi realizada uma nova curva com as concentrações de 1 fg/mL, 0,1 fg/mL e 0,01 fg/mL. Neste ensaio, o controle negativo apresentou um percentual de células viáveis de 86,5%, enquanto o controle positivo apresentou um percentual de 72% de células viáveis, portanto, com uma redução aproximada de 16,76%, em relação ao controle negativo (Figura 10 B). As diferentes concentrações testadas apresentaram, respectivamente, uma viabilidade celular de 74,67%, 83,33% e 84,67%, onde as duas concentrações menores não diferiram estatisticamente do controle negativo. Todavia, a concentração de 1 fg/mL, apesar de apresentar viabilidade celular maior que controle positivo, a mesma foi menor em relação ao controle negativo (p<0,05).



**Figura 10 A-B.** Teste de viabilidade celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B<sub>1</sub>. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3; p<0.05. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; NC=controle negativo; PC=controle positivo.

A citotoxicidade depende da capacidade de uma molécula para se ligar a receptores celulares e/ou penetrar na membrana celular - dependendo do tamanho, conformação estrutural e polaridade do composto, e interferir nos eventos intracelulares (WANG et al., 1991).

É sabido que o tratamento de células CV-1 com FB<sub>1</sub> leva à repressão de certas isoformas da proteína quinase C, à parada do ciclo celular e à morte celular programada. -Em contraste, células do tipo COS-7 – que são células CV-1 que foram transformadas pelo antígeno T do vírus símio 40 (SV40), um adenovírus encontrado em macacos e humanos, apresentam comportamento diferenciado frente à FB<sub>1</sub>, pois não ficam estagnadas na fase G1 e não sofreram morte celular (WANG et al., 1991).

Não obstante, Ciacci-Zanella et al. (1998) estudaram a exposição de células CV-1 à FB<sub>1</sub> e observaram que o bloqueio de seu ciclo celular está relacionado à desfosforilação da proteína Rb (retionblastoma). Adicionalmente, foi observado que a atividade da CDK2 foi reprimida de 5 a 10 vezes e os níveis de proteína ciclina E foram significativamente mais baixos que o controle negativo. Esses eventos suportam a interferência da FB<sub>1</sub> na fase inicial do ciclo celular.

Dentro do mesmo contexto, os mesmos autores identificaram que dois inibidores de CDK, Kip1 e Kip2, foram induzidos dentro de 3 horas após o tratamento de células CV-1 com FB<sub>1</sub>, sugerindo que estas duas proteínas medeiam a interrupção do ciclo celular induzida pela micotoxina (CIACCI-ZANELLA et al. 1998).

Existem poucos estudos na literatura envolvendo Fumonisina B<sub>1</sub> e leucócitos humanos, todavia, Maenetje et al. (2008) confirmam os dados encontrados em nosso estudo,

no qual, a concentração de 50.000 ppb (50 µg/mL), também reduziu a viabilidade celular frente à leucócitos humanos.

Curiosamente, neste mesmo estudo, observou-se um ligeiro aumento na viabilidade celular em uma concentração mais baixa, de 3.125 ppb (3,125 µg/mL), o que contrasta com outros estudos que utilizaram outras linhagens celulares, onde uma diminuição na viabilidade celular foi observada em concentrações mais elevadas, que variaram de 6.250 a 50.000 ppb (6,25 a 50 µg/mL) de FB<sub>1</sub> (MYBURG, R.B et al. 2002).

Adicionalmente, Chuturgoon et al. (2015), testaram a FB<sub>1</sub> em células do hepatocarcinoma humano (HepG2) nas concentrações de 200 µM (14 µg/mL), 100 µM (7,2 µg/mL), 50 µM (3,6 µg/mL), onde a FB<sub>1</sub> causou uma diminuição dose-dependente na viabilidade celular com uma concentração inibitória para 50% do crescimento celular a 200 µM.

Em estudos com animais, Dresden-Osborne et al. (2002), expuseram a FB<sub>1</sub> frente a células de camundongos (células RAW), os quais, constataram que, quanto maior a concentração de FB<sub>1</sub> (1-100 µM), maior foi a sua indução de citotoxicidade, ou seja, quanto maior a concentração, maior a redução de células viáveis.

Em outro estudo, Cetin et al. (2005), utilizando três linhagens de células de mamíferos, CHO-K1, Caco2 e C5-O, foi observado que a FB<sub>1</sub> causou maior resposta sobre as linhagens de células testadas em concentrações maiores que 50 µg/mL, em exposições de 48 a 72 horas.

Ainda dentro desse contexto, Sun et al. (2014) observaram alto percentual de citotoxicidade em células BRL 3A de ratos expostas à FB<sub>1</sub> na concentração de 10 µg/mL. Mais recentemente, Zadeh et al. (2015) analisaram a citotoxicidade da FB<sub>1</sub> em células de fígado de ratos com nanocelulose acrescida de ácidos graxos livres e FB<sub>1</sub> isolada. Como resultado, observaram que a FB<sub>1</sub> isolada teve alta citotoxicidade nas concentrações de 0,1 – 1000 µg/mL, no entanto, quando acrescida de ácidos graxos, a sua toxicidade reduziu significativamente.

Como se pode observar, até o momento a literatura não demonstrou a concentração mínima capaz de induzir toxicidade celular, mas apresenta, em diferentes modelos experimentais, concentrações variadas de FB<sub>1</sub>. Neste sentido, nosso trabalho traz um dado sem precedentes à comunidade científica, uma vez que demonstra com as curvas de concentrações de FB<sub>1</sub> utilizando leucócitos humanos que, na verdade, o perigo de exposição a essa micotoxina pode ser maior ao que se presume que seja. Os estudos têm demonstrado toxicidade celular em concentrações na ordem de microgramas por mililitro dessa micotoxina,

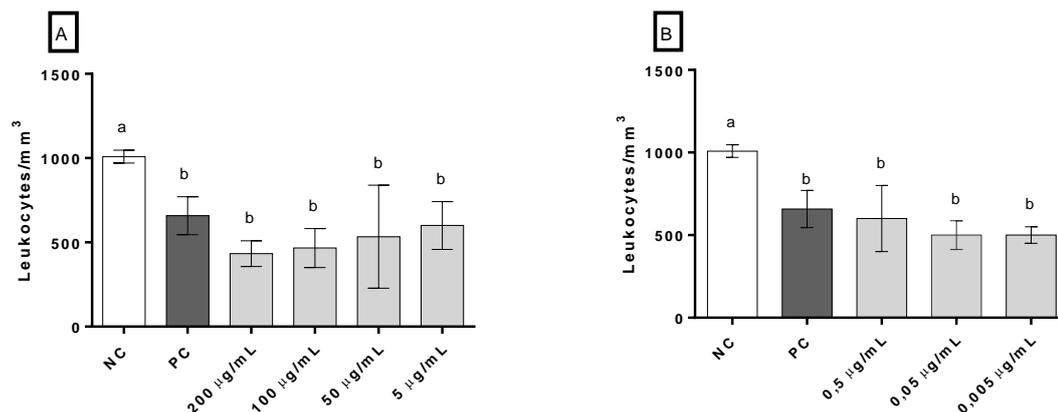
contudo, nosso trabalho demonstrou, claramente, que a citotoxicidade, pelo menos nas condições experimentais e matriz biológica testadas, é capaz de ser evidenciada em concentrações na ordem de fentogramas por mililitro, ou seja,  $10^6$  vezes menor que o abordado pela literatura.

## 5.2 GENOTOXICIDADE

A caracterização de compostos genotóxicos é importante para avaliar a segurança de medicamentos, alimentos e contaminantes ambientais à saúde humana e animal (POWERS et al., 1995). Um considerável número de testes existe para detecção da genotoxicidade de compostos *ex vivo* (HOVHANNISYAN, 2010), incluindo-se aqui o teste de proliferação celular.

Dessa forma, para investigar a genotoxicidade da Fumonisina B<sub>1</sub> foi realizado o teste de proliferação celular. Inicialmente se trabalhou com uma curva de concentração de 200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL e 5 µg/mL (Figura 11 A). Todas essas concentrações testadas apresentaram uma contabilização de leucócitos que variou de  $433,3 \pm 76,38$  a  $600 \pm 141,4$ , as quais foram semelhantes ao controle positivo, mas diferentes do controle negativo ( $p < 0,05$ ).

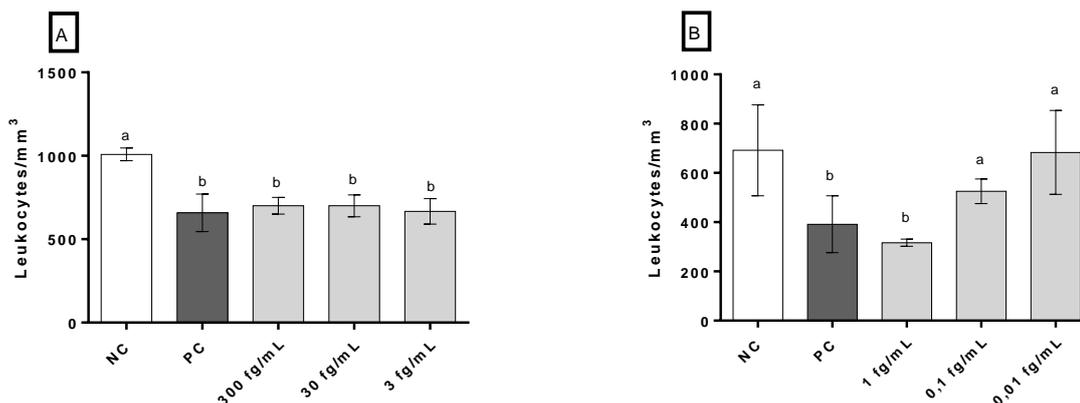
No intuito de determinar a concentração mínima capaz de interferir no processo de proliferação celular, foi realizada uma nova curva com as concentrações de 0,5 µg/mL, 0,05 µg/mL e 0,005 µg/mL (Figura 11 B). Para este ensaio, o controle negativo apresentou uma contabilização leucocitária de  $1008 \pm 38,19$  leucócitos/mm<sup>3</sup>; já o controle positivo contabilizou  $658,3 \pm 112,7$  leucócitos/mm<sup>3</sup>. As três concentrações supracitadas apresentaram uma contabilização celular que variou de  $500 \pm 86,6$  a  $600 \pm 200$  leucócitos/mm<sup>3</sup>, estatisticamente semelhante ao controle positivo, mas diferente do controle negativo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11 A-B** - Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B<sub>1</sub>. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3; p<0,05. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; NC=controle negativo; PC=controle positivo.

Como não havíamos conseguido chegar à concentração mínima capaz de induzir alterações no processo de proliferação celular, foram realizadas duas novas curvas, em diferentes dias, a exemplo do que acontecera no teste de viabilidade celular. A primeira curva (Figura 12 A), foi construída com as concentrações de 300 fg/mL, 30 fg/mL e 3 fg/mL. Todas essas concentrações que contabilizaram uma variação celular de  $666,7 \pm 76,38$  a  $700 \pm 66,2$  leucócitos/mm<sup>3</sup>, que não diferiram do controle positivo, entretanto, apresentaram diferença estatisticamente significativa do controle negativo (p<0,05).

A segunda curva foi construída com as concentrações de 1 fg/mL, 0,1 fg/mL e 0,01 fg/mL (Figura 12 B), que apresentaram uma contabilização de  $316,7 \pm 14,43$  a  $683,3 \pm 170,2$  leucócitos/mm<sup>3</sup>. Contudo, a concentração de 1 fg/mL não diferiu estatisticamente do controle positivo ( $391,7 \pm 115,5$  leucócitos/mm<sup>3</sup>), enquanto as duas menores concentrações apresentaram-se semelhantes estatisticamente ao controle negativo ( $691,7 \pm 184,3$  leucócitos/mm<sup>3</sup>) (p<0,05). Dessa forma, fica evidente que a concentração de 1 fg/mL, nas condições experimentais utilizadas, induz alteração significativa no processo de proliferação celular; ao passo que a concentração de 0,1 fg/mL, dez vezes menor que esta, parece não conseguir mais interferir neste processo.



**Figura 12 A-B** - Ensaio de proliferação celular em leucócitos humanos expostos a diferentes concentrações da Fumonisina B<sub>1</sub>. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3; p<0,05. As letras sobre as barras representam diferenças significativas entre os grupos; NC=controle negativo; PC=controle positivo.

É bem estabelecido que a FB<sub>1</sub> “perturba” a biossíntese de esfingolipídeos através da inibição da ceramida sintase, evitando assim a conversão da esfingosina em diidroceramida e reacilação da esfingosina em ceramida. Isto resulta em aumento das bases esfingóides e dos seus derivados 1-fosfato e diminuição das ceramidas e esfingolipídeos complexos (CHUTURGOON et al., 2015).

No entanto, um aumento da concentração das bases esfingóides só pode ocorrer uma vez que a capacidade da esfingosina-quinase para metabolizar seu substrato tenha sido excedida. Os esfingolipídeos são predominantemente encontrados nas membranas celulares e são críticos para a manutenção da estrutura da membrana, enquanto os esfingolipídeos complexos funcionam como precursores para os segundos mensageiros e são importantes na manutenção do crescimento e diferenciação celular (WESTHUIZEN et al, 2004).

A FB<sub>1</sub> inibe a proliferação celular em vários sistemas de cultura de células, bem como no fígado e rim de ratos. A “perturbação” induzida por ela na biossíntese de esfingolipídeos pode induzir ou prevenir a apoptose, dependendo do tipo de célula e das quantidades relativas das moléculas de esfingolipídeos bioativos gerados (RILEY et al., 2001).

O comprometimento das vias apoptóticas durante a promoção de câncer hepático resulta em um desequilíbrio entre a morte celular e a proliferação e, deste modo, o desenvolvimento de nódulos hepáticos na presença de um promotor. Neste contexto, as células com níveis reduzidos de ceramida e aumento de esfingosina 1-fosfato podem ser selecionadas para sobreviver e proliferar, desde que o aumento das bases esfingóides não seja

inibidor do crescimento nestas células. Assim, a inibição da biossíntese de esfingolipídeos tem sido implicada na atividade carcinogênica da FB<sub>1</sub> (WESTHUIZEN et al, 2004).

Em estudos conduzido por Luongo et al. (2006), foi verificado indução da proliferação dose-dependente em linhagens de células Jurkat linfoblástico T humana expostas a diferentes concentrações de FB<sub>1</sub>, a saber: 20 – 150 µM, (1,44 – 10,8 µg/mL). Já nas concentrações de 0,5 – 80 µM (0,036 – 5,76 µg/mL), a FB<sub>1</sub> testada em sangue total de suínos não produziu qualquer alteração na proliferação celular (LUONGO et al., 2008).

A FB<sub>1</sub> também foi testada em associação a outras micotoxinas em células da granulosa bovina (CG), onde a proliferação celular foi diminuída após exposição de FB<sub>1</sub> em associação com α-ZEA e β-ZEA na concentração de 30 ng/mL (0,03 µg/mL) (ALBONICO et al. 2016). Todavia, não foi estudada a ação isolada da FB<sub>1</sub> sobre a matriz biológica estudada.

Como pode se perceber, os efeitos desta micotoxina sobre a proliferação celular é dependente da tipicidade celular e da faixa de concentração testada. Não obstante, desde o início da década de 1970, estudos sobre indução mitogênica e apoptótica após exposição celular à FB<sub>1</sub> indicam toxicidade específica relacionada à espécie em estudo (CHUTURGOON et al. 2015).

Entretanto, assim como nos testes de viabilidade celular, ao que se refere às menores concentrações (fg/mL) avaliadas em nosso trabalho, também não foi encontrado na literatura nenhum estudo relacionado à proliferação celular.

Adicionalmente, a determinação das taxas de proliferação em culturas de linfócitos é um indicador considerado útil e sensível para demonstrar a ação citostática e citotóxica de vários agentes terapêuticos (CARRANO; NATARAJAN, 1998). A FB<sub>1</sub> tem sido implicada na nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e carcinogenicidade em vários sistemas animais (BULDER et al., 2012). Portanto, conhecer até que faixa de concentração há o aparecimento de alterações celulares, quebras de homeostasia, bem como morte celular é relevante e desejável, tanto para a saúde humana quanto às saúdes animal e vegetal, uma vez que, invariavelmente, estas últimas, em algum momento, acabam por incidir sobre a saúde humana.

Outrossim, estudos complementares deverão ser realizados na matriz experimental utilizada na perspectiva de estudar se a diminuição da proliferação celular observada até a concentração de 1 fg/mL é devida a interferência na maquinaria proteico-enzimática envolvida no ciclo celular ou é proveniente do dano celular relacionado à sua citotoxicidade ou, ainda, o fenômeno observado é proveniente da interferência desses dois vieses.

## 6 CONCLUSÕES

Considerando a exposição de células leucocitárias à Fumonisina B<sub>1</sub> em uma faixa de concentração de 200; 100; 50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 μg/mL e 300; 30; 3; 1; 0,1; 0,01 fg/mL, e período de incubação de 72 horas, foi possível concluir que:

A Fumonisina B<sub>1</sub> demonstrou possuir atividade citotóxica sobre leucócitos humanos nas concentrações testadas de 0,005 a 200 μg/mL, e de 1 a 300 fg/mL, as quais, com exceção da concentração de 1 fg/mL, apresentaram citotoxicidade semelhante ao controle positivo.

As concentrações testadas de 0,005 a 200 μg/mL, e de 1 a 300 fg/mL, demonstraram ser capazes de interferir negativamente no processo de proliferação celular, diminuindo o número de células proliferadas, quando comparadas ao controle negativo.

Com isso, fica evidente a necessidade de estudos complementares relacionados à citotoxicidade e à genotoxicidade da fumonisina B<sub>1</sub>.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

- Estudar os mecanismos que a fumonisina B<sub>1</sub> induz alterações na proliferação celular;
- Estudar mecanismos de lesão celular com foco em apoptose e necrose induzidos pela fumonisina B<sub>1</sub>;
- Avaliar efeitos da fumonisina B<sub>1</sub> acerca de dano oxidativo de DNA e processo mutagênico;
- Determinar a concentração mínima de fumonisina B<sub>1</sub> se for o caso, capaz de induzir dano oxidativo de DNA e mutagênese.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANAZZETI, M.; MELO, P. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, 2007.

ANVISA. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia – GESEF. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológicos necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e0f1d9004e6248049d5fddd762e8a5ec/Guia+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos++vers%C3%A3o+2.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 13/03/2016.

APARICIO, T., IBARRA, A. & MENDEZ, J. Cdc45-MCM-GINS, a new power player for DNA replication. **Cell Div**, 2006.

BAILLY, J. D.; BENARD, G.; JOUGLAR, J. Y.; DURAND, S.; GUERRE, P. Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B<sub>1</sub> in ducks. **Toxicology**, 2001.

BELL, S. P. & DUTTA, A. DNA replication in eukaryotic cells. **Annu Rev Biochem**, 2002.

BEZUIDENHOUT., S.C.; GELDERBLOM, W.C.A.; GORST-ALLMAN C.P.; HORAK, R.M.; MARASAS, W.F.O.; SPITILLER, G.; VLEGGAAR, R. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 82, p. 743-745, 1988.

BOJJA, R.S.; CERNY, R.L.; PROCTOR, R.H.; LIANGCHENG, D. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene – disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.52, p.2855-2860, 2004.

BORDINI, J. G., ROSSI, C. N., HIROOKA, E. Y., ONO, E. Y. S. Impact of Fumonisins, Aflatoxins and Ochratoxin A on Poultry Industry. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, 2013.

BOROBA, A. V., KIPRYUSHINA, Y. O., YAKOVLEV, K.V., ODINTSOVA, N.A. The contribution of apoptosis and necrosis in freezing injury of sea urchin embryonic cells. **Cryobiology**. v. 73. p. 7–14, 2016.

BUROW M.E., WELDON C.B., TANG Y., NAVAR G.L., KRAJEWSKI S, REED JC, HAMMOND TG, CLEJAN S, BACKMAN BS. Differences in susceptibility to tumour necrosis factor alpha-induced apoptosis among MCF-7 breast cancer cell variants. **Cancer Res**. v. 58, p. 4940 – 4946, 1998.

CALDAS, E.D.; SADILKOVA, K.; WARD, B.L.; JONES, A.D.; WINTER, C.K.; GILCHRIST, D.G. Biosynthetic studies of fumonisin B1 and AAL toxins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, p.4734-4743, 1998.

CAMARGOS, S.M.; SOARES, L. M. V.; SAWASAKI I. E.; BOLONHEZI, D.; CASTRO, J. L.; BORTOLLETO, N. Fumonisin in corn cultivars in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2000.

CAPELA, F.S. Avaliação de Biomarcadores. **Dept. de Biologia**, Universidade de Évora, 2001.

CHANG, F., MAY, C. D., HOGGARD, T., MILLER, J., FOX, C. A. & WEINREICH, M. High-resolution analysis of four efficient yeast replication origins reveals new insights into the ORC and putative MCM binding elements. **Nucleic Acids Res**, 2011.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. In: CHOY, W. N; DEKKER, M. (Ed.). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. New York, p.93-113, 2001.

CHUTURGOON A.A., PHULUKDAREE A, D. Fumonisin B1 inhibits apoptosis in HepG2 cells by inducing Birc-8/ILP-2. **Toxicol Letters**, 2015.

CIACCI-ZANELLA JR, MERRILL AH., JR., WANG E., JONES C. Characterization of Cell-cycle Arrest by Fumonisin B1 in CV-1 Cells. **Food Chem Toxicol**, 1998.

COMBES, R.D. Genotoxicity testing: recent advances and future trends. **Chemistry & Industry**. v. 24. p. 950-954, 1992.

D'MELLO, J. P. F.; MACDONALD, A. M. C. Mycotoxins. **Animal Feed Science And Technology**, 1997.

DRABLOS, F.; FEYSI, E.; AAS, P. A.; VAAGDO, C. B.; KAVLI, B.; BRATLIE, M. S.; PENA, J.; OTTERLEI, M.; SLUPPHAUG, G.; KROKAN, H. E. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. **DNA Repair (Amst)**, 2004.

ERDTMANN, B. A genotoxicidade nossa de todos os dias. In: Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: **Alcance**, 2003.

FERRETTI, L. P., LAFRANCHI, L. & SARTORI, A. A. Controlling DNA-end resection: a new task for CDKs. **Front Genet.**, 2013.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. Micotoxinas. v.7. Disponível em: [www.revista-fi.com](http://www.revista-fi.com) (2009). Acesso em 23/04/2016.

FRESHNEY, R.I. Culture of Animal Cells. **A Manual of Basic Technic**. 3 ed. New York: Wiley-Liss, 1994.

GALVANO, F., RUSSO, A., CARDILE, V., GALVANO, G., VANELLA, A., RENIS, M. DNA damage in human fibroblasts exposed to fumonisin B<sub>1</sub>. **Food Chem. Toxicol.**, 2002.

GUIDUGLI-NETO, J. Elementos de Patologia Geral. **São Paulo**, 1997.

GUMPRECHT L.A., BEASLEY V.R., WEIGEL R.M., PARKER H.M., Tumbleson M.E., Bacon C.W., Meredith F.I., Haschek W.M.. Development of fumonisin-induced hepatotoxicity and pulmonary edema in orally dosed swine: morphological and biochemical alterations. **Toxicol Pathol.**, 1998.

GRIVICICH, I; REGNER, A; ROCHA, A. Morte Celular por Apoptose. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HARTMANN A., AGURELL E., BEEVERS C., BRENDLER-SCHWAAB S, BURLINSON B., CLAY P., COLLINS A., SMITH G, SPLEIT G., THYBAUD V, TICE R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagenesis**. v. 18, p. 45 – 51, 2003.

HIROOKA, E. Y.; YAMAGUCHI, M. M.; AOYAMA, S.; SUGIURA, Y.; UENO, Y. Natural occurrence of fumonisins in brasilian corn kernels. **Food Additives and Contaminants**, 1996.

HOVHANNISYAN, G.G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology. **Molecular Cytogenetics**, 2010.

IAMANAKA, B. T., OLIVEIRA I.S., TANIWAKI, M. H. Micotoxinas em alimentos. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, vol 7, p. 138-161, 2010.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 7.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. p. 209-217, 2000.

KAYSER, F. M., Medical Microbiology. New York. **Thieme**. p. 348-353, 2005.

KELLY, T. J. & BROWN, G. W. Regulation of chromosome replication. **Annu Rev Biochem**, 2000.

KEEPERS, Y.P.; PIZAO, P.E.; PETERS, G.J.; ARK-OTTE, J.; WINOGRAD, B.; PINEDO, H.M. Comparison of the Sulforhodamine B Protein and Tetrazolium (MTT) Assays for in vitro Chemosensitivity Testing. **Eur J Cancer**. v. 27, n. 7, p.897-900, 1991.

KITAGAWA, M., KITAGAWA, K., KOTAKE, Y., NIIDA, H. & OHHATA, T. Cell cycle regulation by long non-coding RNAs. **Cell Mol Life Sci**, 2013.

KLOSE, R. J. & BIRD, A. P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci**, 2006.

KULTZ, D. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. **Annu**. 2005.

LEI, M. The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy. **Curr Cancer Drug Targets**, 2005.

LEI, M. & TYE, B. K. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. **J Cell Sci**, 2001.

LIU, X. et al. Potential and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment. **Toxicology Letters**, v. 211, p. 70-76, 2012.

LOTZE, M.T.; THOMSON, A.W. Measuring Immunity: Basic Science and Clinical Practice. 1ª ed. **Elsevier Science**. London: p. 344-346, 2005.

LUO, J. H. Oncogenic activity of MCM7 transforming cluster. **World J Clin Oncol**, 2011.

MAGA, G. & HUBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **J Cell Sci**, 2003.

MALUF, S.W., ERDTMANN, B. Biomonitoração do dano genético em humanos. In: SILVA, J. DA; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (Orgs.) **Genética toxicológica**, 2003.

MALUMBRES, M.; BARBACID M. Cell cycle, CDK1 and câncer: a changing paradigma. **Nat. Ver Cancer**, 2009.

MARASAS, W.F.O. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. **Environ. Saúde Perspect**, 2001.

MARÍN, S.; SANCHIS, V.; VINAS, I.; CANELA, R.; MAGAN, N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. **Letters in Applied Microbiology**. v.21, p.298-301, 1995.

MARZZOCO, A.; TORRES, S. B. Bioquímica básica. 2.ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1999.

MENDES-GIANINI, M. J. S., MELHEM M.S.C.; FERREIRA, A. W. Diagnóstico das principais doenças infecciosas e auto-imunes. 2ª Ed. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**. p. 334-403, 2001.

MERRILL A.H. Jr., SWEELEY C.C. Sphingolipids: metabolism and cell signaling. In: Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Vance DE, Vance JE, eds). New York: **Elsevier**, 1996.

MERRILL Jr., A.H., SULLARDS, M.C., WANG, E., VOSS, K.A., RILEY, R.T. Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. **Environ Health Perspect**, 2001.

MINAMI, L.; MEIRELLES, P. G.; HIROOKA, E. Y.; ONO, E.Y.S. Fumonisins: Toxicological effects, mechanism of action and biomarkers for exposure assessment. **Semina**, 2004.

MOBIO, T. A.; ANANE, R.; BAUDRIMONT, I.; ARRATU M. R.; SHIER, W. T.; ANO-DJEDJE, S.; UENO, Y., REPPY E. E. Epigenetic properties of fumonisin B1: cell cycle arrest and DNA base modification in C6 glioma cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2000.

MURPHY, P.A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; DRYANT, C.M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v.71, n.5, 2006.

NASCIMENTO, P. A. et al. Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. **Brazilian Journal and Biological Research**, v.34, p.165-176, 2001.

NATARAJAN, T. e PALLITI, F. DNA Repair, Chromosomal Alterations. **Mutation Research**, v. 65, p. 86-98, 2008.

ONO, E. Y.; SUGIURA, Y.; HOMECHIN, M.; KAMOGAE, M.; VIZZONI, E.; UENO, Y.; HIROOKA, E. Y. Effect of climatic conditions on natural mycoflora in fumonisins freshly harvested corn of the state of Paraná, Brazil. **Mycopathologia**. 1999.

PADMANABHAN, V., CALLAS, P., PHILIPS, G., TRAINER, T. D. & BEATTY, B. G. DNA replication regulation protein Mcm7 as a marker of proliferation in prostate cancer. **J Clin Pathol**, 2004.

PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases. **Arq Gastroenterol**. V. 38 - no. 2, 2001.

POWERS, R.E.; LAWTON, G.P.; MODLIN, I.M. Genotoxicity, carcinogenicity and acid-suppressing medications. **Pharmacology & Therapeutics**, 1995.

QUEIROZ, V. A. V.; ALVES, G. L. O.; CONCEIÇÃO, R. R. P.; GUIMARÃES, L. J. M.; MENDES, S. M.; RIBEIRO, P. E. A.; COSTA, R. V. Occurrence of fumonisins and zearalenone in maize stored in family farm in Minas Gerais, Brazil. **Food Control**. 2012.

RILEY R.T., AN N.H., SHOWKER J.L., YOO H-S, NORRED W.P., CHAMBERLAIN W. J., WANG E., MERRILL A.H. Jr., MOTELIN G., BEASLEY V.R. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: an early biomarker of exposure to fumonisin- containing feeds in pigs. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1993.

RILEY R.T., ENONGEN E., VOSS K.A., NORRED W.P., MEREDITH F.I., SHARMA R.P., WILLIAMS D., MERRILL A.H. Jr. Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. **Environ Health Perspect**, 2001.

SANTOS MONTAGNER, G. F. F.; SAGRILLO, M.; MACHADO, M. M.; ALMEIDA, R. C.; MASTARDEIRO, C. P.; DUARTE, M. M. M. F.; CRUZ, I. B. M. Toxicological effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism genotype. *Toxicology in Vitro*, v. 24, p. 1410-1416, 2010.

SANTOS, M. C.; SOUZA, R. B.; OLIVEIRA, S. E. M.; LIMA, K. S. C.; LIMA, A. L. S. Micotoxinas e seu Potencial como Agentes de Guerra. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 3, p. 761-778, 2014.

SARGENT, J.M. The use of the MTT assay to study drug resistance in fresh tumour samples. **Recent Results Cancer Res**, v. 161, p. 13-25, 2003.

SCHAFFER, K. A. *The cell cycle: a review*. Vet Pathol, 1998.

SHEPHARD, G.S., THIEL, P.G., SYDENHAM, E.W., VLEGGAR, R., ALBERTS, J.F. Determination of the mycotoxin fumonisin B<sub>1</sub> and identification of its partially hydrolysed metabolites in the faeces of non-human primates. **Food Chem Toxicol**, 1994.

SIDRIM, J. J. C, ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, 2004.

SILVA, J; ERDTMANN B; HENRIQUES, J.A.P. Genética toxicológica. Porto Alegre: **Alcance**, 2003.

SILVA, J. O. Ocorrência de aflatoxinas B<sub>1</sub> em arroz consumido por militares do exército brasileiro por cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência – Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, 2005.

SORIANO, J.M.; GONZÁLEZ, G.; CATALÁ, A.I. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B<sub>1</sub>. **Prog. Lipid Res**, 2005.

SUZUKI, S., ADACHI, A., HIRAIWA, A., OHASHI, M., ISHIBASHI, M. & KIYONO, T. Cloning and characterization of human MCM7 promoter. **Gene**, 1998.

SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPARD, G. S.; THIEL, P.G.; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1992.

TYE, B. K. MCM proteins in DNA replication. **Annu Rev Biochem**, 1999.

VERMEULEN, K., VAN BOCKSTAELE, D. R. & BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.** p. 131–149, 2003.

VOSS, K.A., RILEY, R.T., NORRED, W.P., BACON, C.W., MEREDITH, F.I., HOWARD, P.C. An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and Fusarium moniliforme. **Environ Health Perspect**, 2001.

WANG, E.; NORRRED, W. P.; BACON, R. T.; RILEY, R. T.; MERRIL JR.; A. H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: implications for diseases associated with Fusarium moniliforme. **Journal of Biological Chemistry**, 1991.

WANG, E.; NORRRED, W. P.; BACON, R. T.; RILEY, R. T.; MERRIL JR.; Inhibition of sphingolipid bio- synthesis by fumonisins. **Journal of Biological Chemistry**, 1991.

WANG, K., SHI, Z., ZHANG, M. & CHENG, D. Structure of PCNA from Drosophila melanogaster. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, 2013.

WESTHUIZEN, L.V.D.; SHEPARD, G.S.; SCUSSEL, L.L.F.C.; VISMER, H.F.; RHEEDER, J.P.; MARASAS, W.F.O. Fumonisin contamination and Fusarium incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2003.

WILSON, D. M.; SOFINOWSKI, T. M.; MCNEILL, D. R. Repair mechanisms for oxidative DNA damage. **Front Biosci**, 2003.

YOUNG, B.; HEATH, J.W. Weather – Histologia funcional: texto e atlas em cores. 3.ed. Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara Koogan**, cap 9. p. 97-110, 2001.

ZAIN, M. E. *Impact of mycotoxins on humans and animals*. **Journal of Saudi Chemical Society**, Vol 15, Issue 2. p. 129-144, 2010.

ZHOU, Y. M., ZHANG, X. F., CAO, L., LI, B., SUI, C. J., LI, Y. M. & YIN, Z. F. MCM7 expression predicts post-operative prognosis for hepatocellular carcinoma. **Liver Int**, 2012.