

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

IVANA CASTILHOS AQUINO

**AÇÃO PROTETORA DA HESPERITINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA**

Itaqui

2015

IVANA CASTILHOS AQUINO

**AÇÃO PROTETORA DA HESPERITINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA**

Trabalho de Conclusão de Curso elaborado como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal do Pampa- Campus Itaqui.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Co-orientadora: Prof. Dra. Silvana Peterini Boeira

Itaqui

2015

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

A657a Aquino, Ivana Castilhos

AÇÃO PROTETORA DA HESPERITINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA
/ Ivana Castilhos Aquino.

18 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) --
Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM
NUTRIÇÃO, 2015.

"Orientação: Cristiano Ricardo Jesse".

1. Antioxidante. 2. Hematologia. 3. Toxicidade.
4. Camundongos. I. Título.

IVANA CASTILHOS AQUINO

**AÇÃO PROTETORA DA HESPERITINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA**

Trabalho de Conclusão de Curso
elaborado como requisito parcial para
obtenção do Título de Bacharel em
Nutrição pela Universidade Federal
do Pampa - Campus Itaqui.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em 27 de junho de 2015

Banca examinadora:



Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Orientador

(UNIPAMPA)



Prof. Ms. Lucian Del Fabbro

(UNIPAMPA)



Ms. Marcelo Gomes de Gomes

(UNIPAMPA)

Dedico à minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus orientadores Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse e Prof. Dr. Silvana Peretini Boeira, por terem me proporcionado a oportunidade de ter trabalhado e convivido com vocês, pelos ensinamentos, pela compreensão, pelo apoio incondicional, por serem referências na minha vida acadêmica e pela confiança. Muito obrigada por tudo!

Aos meus pais, Ana e Ivan, por apoiarem minhas decisões pelo suporte financeiro, por serem paciosos e motivarem meus estudos.

A minha avó Maria Aquino, por ser sinônimo de amor incondicional e por ter me dado todo o suporte emocional necessário. Te amo!

Ao meu companheiro, Cauê, por todo o amor, carinho e compreensão que tem me dedicado. Pela paciência nos momentos de minha ausência, e pelo incentivo em continuar esta caminhada em busca dos meus sonhos. Grata por tudo!

Ao Laftambio Pampa, e ao Ms. Marcelo Gomes de Gomes pela dedicação em ajudar a desenvolver este trabalho.

À Universidade Federal do Pampa por tornar possível o sonho da graduação.

Aos demais amigos e colegas que colaboraram de alguma forma direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas colegas Franciéle e Graciéle, pelo apoio, companheirismo, cumplicidade e pela amizade construída.

As minhas amigas Bruna, Laura, Lucia, Mariana, Naiane pelo apoio durante a graduação e na vida pessoal. Por toda a nossa vivência, vocês foram o alicerce para eu seguir em frente, me deixaram mais forte e nunca deixaram eu desistir!

Obrigada a todos que, mesmo não estando citados aqui, contribuíram para a conclusão desta etapa importante na minha vida.

Enfim, por último, mas não menos importante, agradeço a Deus por me conceder o dom da vida, e por ter me colocado no caminho de pessoas abençoadas e puras de coração.

SUMÁRIO

FICHA DE SUBMISSÃO	8
RESUMO	9
ABSTRACT	9
CURRÍCULUM	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
CONCLUSÃO	15
REFERÊNCIAS	15
ANEXO I	18

FICHA DE SUBMISSÃO
Artigo Submetido à Revista Clínica Veterinária

**AÇÃO PROTETORA DA HESPERITINA SOBRE AS ALTERAÇÕES
HEMATOLÓGICAS INDUZIDAS PELA MICOTOXINA ZEARALENONA**

Ivana Castilhos Aquino^a, Franciele Romero Machado^a, André Rossito Goés^{a,b},

Silvana Peterini Boeira^a, Cristiano Ricardo Jesse^{a,b*}

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

^b Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, 97500-970, Uruguaiana, RS, Brasil



RESUMO

A zearalenona (ZEA) proveniente do fungo *Fusarium graminearum*, tem muitos efeitos tóxicos ao organismo. É considerada hematotóxica e produz efeitos sobre o sistema oxidante. Assim, a hesperitina, um importante antioxidante encontrado em frutas cítricas, pode atuar como um importante antioxidante frente às ações tóxicas da ZEA. Assim, objetivou-se analisar a ação antioxidante da hesperitina como fator preventivo, frente às alterações hematológicas induzidas pela ZEA em camundongos. Foram utilizados 20 camundongos Swiss machos divididos em 4 grupos (n=5): grupo 1 (Salina+ Azeite de oliva), grupo 2 (Hesperitina 25 mg/Kg +Azeite de oliva), grupo 3 (Salina + ZEA 40 mg/Kg) e grupo 4 (Hesperitina 25 mg/Kg +ZEA 40 mg/Kg). Por 10 dias consecutivos administrou-se a hesperitina (50 mg/Kg/dia, p.o) e à partir do 11º dia administrou-se apenas a ZEA (40 mg/Kg/dia, p.o). Após 48 horas, procedeu-se a eutanásia dos animais onde o sangue foi coletado por punção cardíaca. As amostras de sangue foram homogeneizadas e analisadas em contador automático, para a contagem total de RBC, WBC, VCM, HCM, CHCM, HT, HGB e Plaquetas. Após, foi utilizada a técnica do esfregaço sanguíneo para a contagem diferencial de neutrófilos (segmentados e bastões), eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. A análise estatística foi feita por meio da Análise de Variância (ANOVA) de duas vias. A ZEA provocou hematotoxicidade através do aumento de leucócitos totais assim como aumento de hemoglobina e hematócrito e diminuiu o número de hemáceas além de linfócitos e plaquetas. O pré-tratamento com o hesperitina preveniu o aparecimento dos efeitos tóxicos induzidos pela ZEA em praticamente todos os parâmetros analisados e assim, este antioxidante pode ser utilizado como uma alternativa na prevenção dos danos causados pela ZEA.

Palavras-chaves: antioxidante, hematologia, toxicidade, camundongos.

ABSTRACT

Zearalenone (ZEA) from the fungus *Fusarium graminearum*, have many toxic effects on the body. It is considered hematotóxica and take effect on the oxidant system. Thus, hesperetin, an important antioxidant found in citrus fruits, can act as an important antioxidant opposite to toxic actions of ZEA. The objective was to analyze the antioxidant action of hesperetin as a preventive factor, compared to hematological changes induced by ZEA in mice. We used 20 male Swiss mice divided into 4 groups (n = 5): Group 1 (Salina + olive oil), group 2 (hesperetin 25 mg / kg + olive oil), group 3 (Salina + ZEA 40 mg / kg) and group 4 (hesperetin 25 mg / kg + ZEA 40 mg / kg). For 10 consecutive days administered to hesperetin (50 mg / kg / day, po) and from the 11th day administered only to ZEA (40 mg / kg / day, po). After 48 hours, animal euthanasia was carried out where blood was collected by cardiac puncture. Blood samples were homogenized and analyzed with an automatic counter for the total count of RBC, WBC, MCV, MCH, MCHC, HT, HGB and platelets. After it was used the blood smear technique for differential counting of neutrophils (segmented and bats), eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) of two ways. The ZEA hematotoxicity caused by increased total leukocytes, as well as increase in hemoglobin and hematocrit, and decreased the number of lymphocytes as well as erythrocytes and platelets. The pre-treatment with hesperetin prevented the onset of toxic effects induced by ZEA in virtually all parameters and thus, this antioxidant may be used as an alternative in the prevention of damage by ZEA.

Keywords: antioxidant, hematology, toxicity, mice.

CURRÍCULUM

La zearalenona (ZEA) a partir del hongo *Fusarium graminearum*, tiene muchos efectos tóxicos en el cuerpo. Se considera hematotóxica y tomar efecto sobre el sistema oxidante. Por lo tanto, hesperetina, un importante antioxidante encuentra en los cítricos, puede actuar como un importante antioxidante frente a las acciones tóxicas de ZEA. El objetivo fue analizar la acción antioxidante de hesperetina como un factor preventivo, en comparación a los cambios hematológicos inducidos por ZEA en ratones. Se utilizó 20 ratones Swiss machos divididos en 4 grupos (n = 5): Grupo 1 (aceite de oliva Salina +), grupo 2 (hesperetina 25 mg kg de aceite de oliva / +), grupo 3 (ZEA Salina + 40 mg / kg) y el grupo 4 (hesperetina 25 mg / kg + ZEA 40 mg / kg). Durante 10 días consecutivos administrados a hesperetina (50 mg / kg / día, po) y desde el día 11 administrada sólo para ZEA (40 mg / kg / día, por vía oral). Después de 48 horas, la eutanasia de los animales se llevó a cabo donde la sangre se recogió por punción cardíaca. Las muestras de sangre se homogeneizaron y se

analizaron con un contador automático para el recuento total de glóbulos rojos, leucocitos, MCV, MCH, MCHC, HT, HGB y plaquetas. Después de que se utilizó la técnica de frotis de sangre para el recuento diferencial de neutrófilos (segmentados y murciélagos), eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. El análisis estadístico se realizó por análisis de varianza (ANOVA) de dos maneras. La hematotoxicidad ZEA causado por el aumento de los leucocitos totales, así como aumento de la hemoglobina y el hematocrito, y la disminución del número de linfocitos, así como eritrocitos y plaquetas. El pre-tratamiento con hesperetina impidió la aparición de efectos tóxicos inducidos por la ZEA en prácticamente todos los parámetros y por lo tanto, este antioxidante se puede utilizar como una alternativa en la prevención de daños por ZEA.

Palabras clave: antioxidantes, toxicidad, hematología, ratones.

INTRODUÇÃO

As micotoxinas são substâncias tóxicas produzidas a partir de fungos ocasionando efeitos nocivos em seres humanos e animais. A contaminação de alimentos e rações por micotoxinas representa um sério problema de saúde pública, além de se constituir em considerável obstáculo à economia de países produtores de grãos, como o Brasil. O conhecimento dos efeitos tóxicos causados pelas micotoxinas nos alimentos e rações é, sem dúvida, o primeiro passo para a implementação de programas que permitam a adoção de medidas apropriadas para a prevenção e redução do problema.¹

A zearalenona, uma micotoxina derivada do fungo *Fusarium graminearum*, é produzida em condições de estresse. No armazenamento de grãos, a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultado da relação entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de carbono, presença de insetos e fungos.² Além disso, esta micotoxina é termoestável sobrevivendo a altas temperaturas de cocção além de permanecer ativa durante toda a cadeia de produção agrícola.³

Os efeitos tóxicos da ZEA têm sido atribuídos principalmente à sua estrutura química muito parecida com a dos estrógenos naturais.⁴ A ZEA afeta principalmente o sistema reprodutivo, no entanto, ela pode produzir efeitos adicionais, como a hematotoxicidade. O sistema hematológico apresentou os efeitos nocivos induzidos pela ZEA através do aumento do número de leucócitos totais e suas frações (bastões, segmentados, eosinófilos e monócitos) e diminuição do número de linfócitos e plaquetas sugerindo que esta micotoxina atua por diminuir a imunidade dos animais acometidos levando a alterações nas células sanguíneas.⁵

Entre as muitas classes que compõem os compostos fenólicos, os flavonoides são considerados importantes para a alimentação animal e humano, devido a sua ampla distribuição em frutas, hortaliças e legumes, além de grãos, cereais e leguminosos. Os flavonoides têm várias funções nutricionais que têm sido descritas como modificadores da resposta biológica onde a maioria atua como antioxidantes, e alguns têm propriedades anti-inflamatórias.⁶ O composto hesperidina é um subproduto abundante e barato do cultivo de citros e é o principal flavonoide encontrado em laranja. É um glicosídeo da sua forma aglicona hesperitina. A hesperitina junto com o dissacarídeo rutinose é o mesmo que o composto hesperidina.⁷ É de conhecimento que as frutas cítricas possuem quantidades apreciáveis destes compostos, como os flavonóides cítricos (hesperitina e naringina), além da vitamina C, que apresentam ação antioxidante, vaso protetora e hipocolesterolêmica. A hesperitina (HT), um flavonoide encontrado em frutas cítricas, é amplamente conhecida por sua atividade antioxidante e antiinflamatória. Estudos demonstraram a ação deste flavonoide natural no aumento da imunidade em humanos através do aumento no número de linfócitos e outros marcadores sanguíneos. Assim, este trabalho avaliou a ação protetora deste flavonoide em função das alterações hematológicas induzidas pela micotoxina zearalenona em camundongos machos.⁸

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental conduzido no Laboratório de Análises Farmacológicas e Toxicológicas aplicadas às moléculas bioativas (Laftambio Pampa) da Universidade Federal do Pampa – Campus Itaqui entre os períodos de abril/junho do ano de 2015. Para a amostra desse estudo utilizaram-se 20 camundongos Swiss machos de 90 dias de idade com pesos entre 25-35 gramas, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Ressalta-se que este experimento foi aprovado pelo Comitê de ética para estudos com animais.

Os animais foram divididos aleatoriamente em diferentes grupos, integrando o grupo controle e os grupos experimentais para assim fazer a comparação dos valores obtidos ao final do experimento. Foi dividido o número total de animais em 4 grupos (n=5), constituindo-se a cada grupo um tratamento específico, conforme é mostrado logo abaixo:

Grupo 1: Salina (0,9%)+ Azeite de oliva (10 ml/Kg)

Grupo 2: Hesperitina 25 mg/Kg + Azeite de oliva

Grupo 3: Salina + ZEA 40 mg/Kg

Grupo 4: Hesperitina 25 mg/Kg +ZEA 40 mg/Kg

Os animais de cada grupo foram abrigados em caixas de polipropileno em condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas), temperatura controlada (22 ± 2 °C), com água e alimentos *ad libitum*.

A HT (25 mg/Kg) e o veículo foram administrados por via oral (p.o), via gavagem, durante 10 dias consecutivos. No 11° dia os animais receberam uma dose de ZEA (40 mg/Kg) por via oral, via gavagem. Após 48 horas do tratamento com a micotoxina, os animais receberam uma dose de pentobarbital (180 mg/kg, i.p.) e o sangue foi coletado por punção cardíaca e colocado em tubos contendo o anticoagulante EDTA.

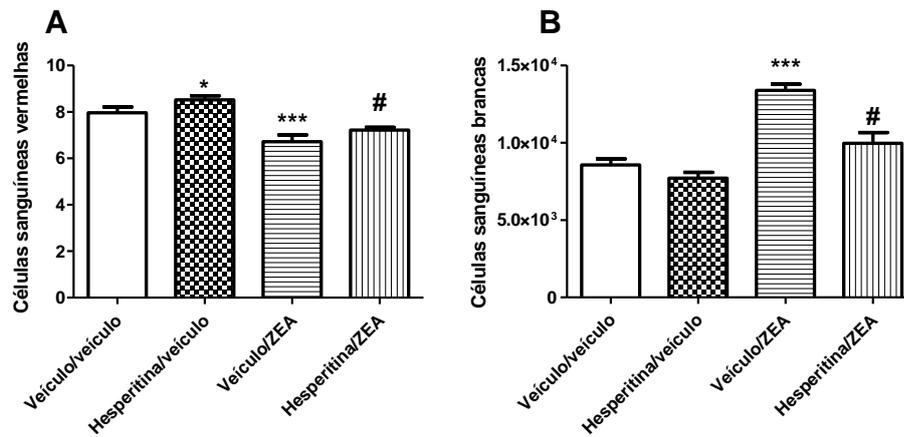
As amostras foram analisadas em contador automático Mindray, BC-2800 Vet model para a contagem total de RBC (glóbulos vermelhos), WBC (leucócitos), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média), HTC (hematócrito), HGB (hemoglobina), VPM (volume plaquetário médio) e Plaquetas. Posteriormente, as amostras de sangue foram utilizadas para a realização da técnica do esfregaço sanguíneo para a contagem diferencial de neutrófilos (segmentados e bastões), eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos com 5ul de sangue. Após a realização do mesmo com a utilização do corante panótico rápido, as lâminas serão visualizadas em microscópio da marca Nycon em aumento de 100x.

Para a realização da estatística foi utilizado o programa Graph Pad Prism 5. Inicialmente foi realizada a Análise de Variância (ANOVA) de duas vias. Com a interação de uma das vias, foi realizado o teste Newman-Keuls para comparação dos grupos tratados com o grupo controle. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem inferir que a administração da ZEA na dosagem de 40 mg/Kg provocou danos nos parâmetros hematológicos avaliados. O quadro clínico das intoxicações causadas pela ZEA varia muito, de acordo com a quantidade de toxina ingerida, o tempo de ingestão, sexo do animal e estágio reprodutivo.⁹ Observou-se que ZEA foi capaz de aumentar o número de leucócitos totais indicando uma possível resposta inflamatória, como mostra a Fig. 1. Os leucócitos são as células responsáveis pela defesa do nosso organismo, agem diretamente contra microrganismos patógenos e qualquer outra substância estranha que venha a se instalar em nosso corpo. No grupo Hesperitina/ZEA, podemos observar que este antioxidante deteve o aumento de leucócitos, indicando um controle à micotoxina.

Figura 1 - Efeito da administração da hesperitina (25 mg/kg, p.o.) e da ZEA (40 mg/kg, p.o.) no número de células sanguíneas vermelhas (A) e brancas (B) nos camundongos. Os dados são demonstrados através de média \pm erro padrão para um número=5 animais por grupo. *** indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/veículo. * indica uma diferença significativa ($p < 0.05$) comparada ao grupo veículo/veículo. # indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/ZEA.

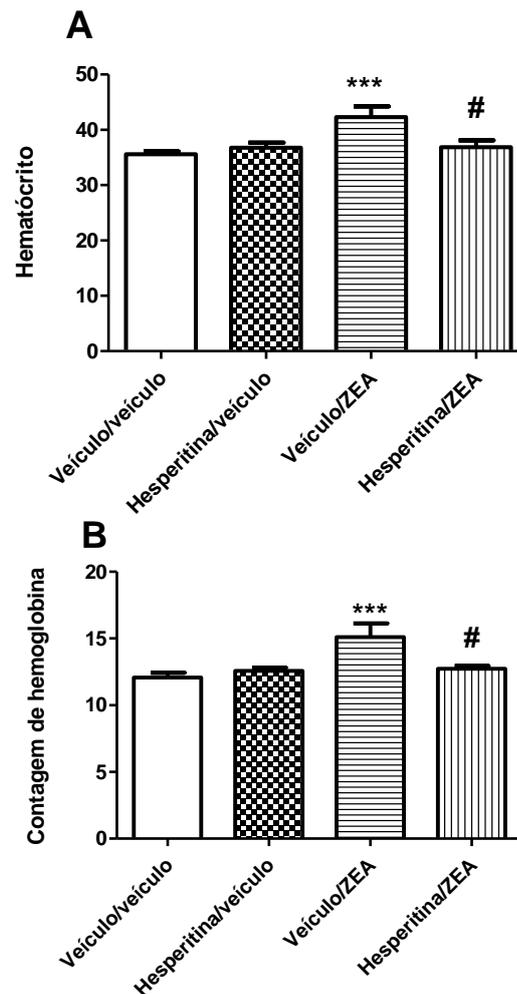


A hematoxicidade da ZEA ainda é pouco relatada na literatura ^{10,5,11,12} e em consequência disto não há um mecanismo definido para explicar a toxicidade desta micotoxina nas células sanguíneas. Um estudo feito indicou que uma única dose intraperitoneal de zearalenona induziu à mudanças nos parâmetros hematológicos, assim como em nosso estudo.¹¹

A HGB e HTC são variáveis importantes no contexto da avaliação nutricional através de exames laboratoriais.¹³ A hematoxicidade da ZEA pode ser observada no estudo feito com ratos, no qual foram submetidos a intoxicação superior a 10mg/kg de ZEA, resultando em alterações em alguns parâmetros hematológicos, como o aumento de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos e redução no volume plaquetário.¹¹

No presente trabalho, foi possível demonstrar o aumento de hematócrito e hemoglobina (Fig. 2), bem como a diminuição no número de hemácias predizendo que a ZEA foi capaz de induzir a hemólise (destruição prematura das hemácias) e levar os animais ao quadro de anemia. Já no grupo interação Hesperitina/ZEA, a HT atuou como um efetivo protetor reequilibrando o número de hemáceas, HTC, HGB.

Figura 2 - Efeito da administração da hesperitina (25 mg/kg, p.o.) e da ZEA (40 mg/kg, p.o.) no hematócrito (A) e contagem de hemoglobina (B) no sangue dos camundongos. Os dados são demonstrados através de média \pm erro padrão para um número=5 animais por grupo. *** indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/veículo. # indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/ZEA.



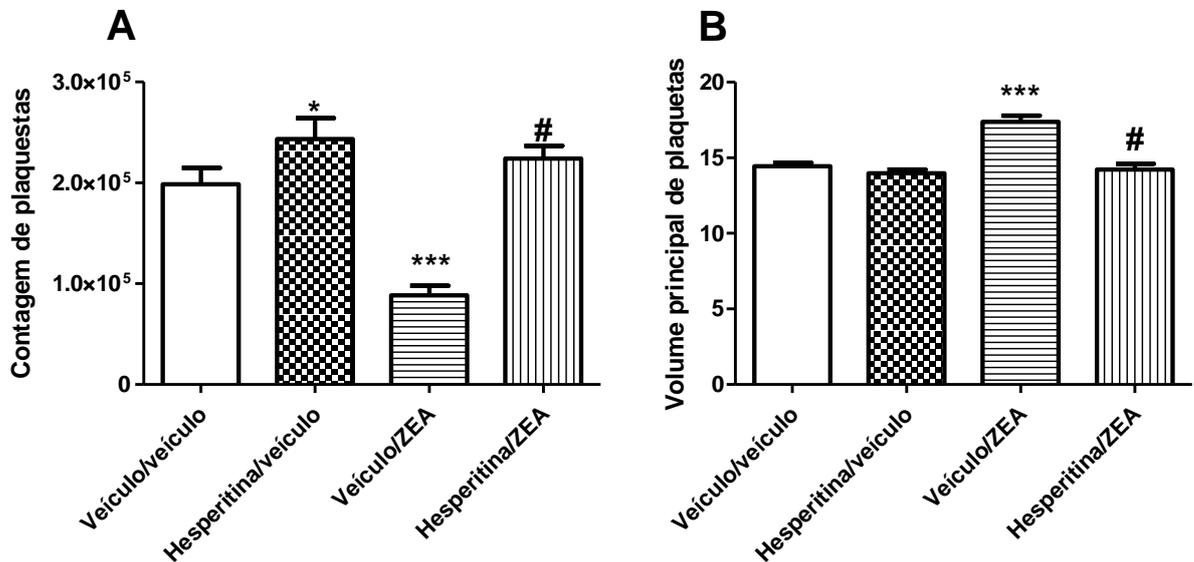
No estudo desenvolvido com camundongos Balb/C, a toxicidade aguda com ZEA promoveu alteração na coagulação e um aumento nos níveis de hematócrito, hemoglobina, hemácias e leucócitos, semelhante ao encontrado em nosso estudo, diferindo-se apenas da diminuição do número hemácias.¹⁰

Responsáveis pelo início do processo de coagulação, graças à ação das plaquetas, o organismo tem tempo de reparar os tecidos lesados sem que haja muita perda de sangue. A ZEA por ser imunossupressora, é capaz de promover alterações no tempo de protrombina, dificultando o tempo de coagulação do sangue através da sua ação sobre os fatores de coagulação.¹⁴ Em nosso trabalho a ZEA foi capaz de diminuir significativamente a contagem plaquetária como é possível observar na Figura 3 (A). A diminuição do número de plaquetas pode estar relacionada com alterações na coagulação sanguínea.¹¹

Autores observaram uma redução significativa, do número de plaquetas após o tratamento com a ZEA, mostrando assim os efeitos deletérios da ZEA sobre o sistema plaquetário. Em nosso trabalho, além da diminuição do número de plaquetas, a ZEA provocou aumento do volume plaquetário e a HT atuou de modo preventivo nos dois parâmetros analisados.⁵ O aumento da destruição periférica das plaquetas com consequente aumento da trombopoiese pode ser um fator que justificaria o aumento do VPM pela ação tóxica da ZEA.¹⁵

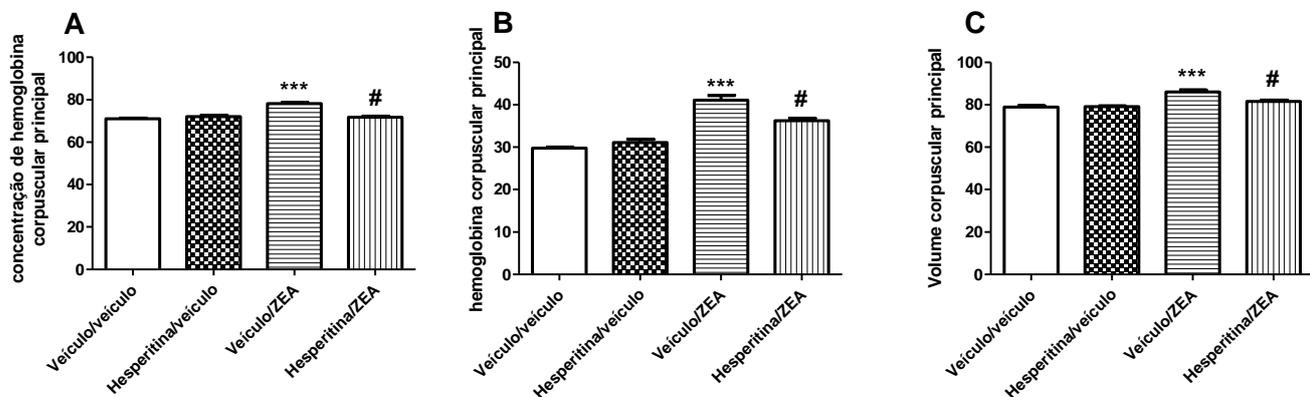
Figura 3 - Efeito da administração da hesperitina (25 mg/kg, p.o.) e da ZEA (40 mg/kg, p.o.) na contagem de plaquetas (A) e do volume principal de plaquetas (B) no sangue dos camundongos. Os dados são demonstrados através de média \pm erro padrão para um número=5 animais por grupo. *** indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/veículo. * indica uma

diferença significativa ($p < 0.05$) comparada ao grupo veículo/veículo. # indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/ZEA.



Alterações nos parâmetros sanguíneos foram relatados, em um trabalho onde usou-se camundongos, dos quais foram tratados via gavagem com uma única dosagem de ZEA de 40 mg/kg¹⁰, semelhante ao presente trabalho, demonstrando assim a toxicidade que a zearalenona tem sobre os parâmetros hematológicos. Nosso trabalho mostra que a hesperitina foi capaz de proteger contra o aumento de CHCM, HCM e VCM (Fig. 4).

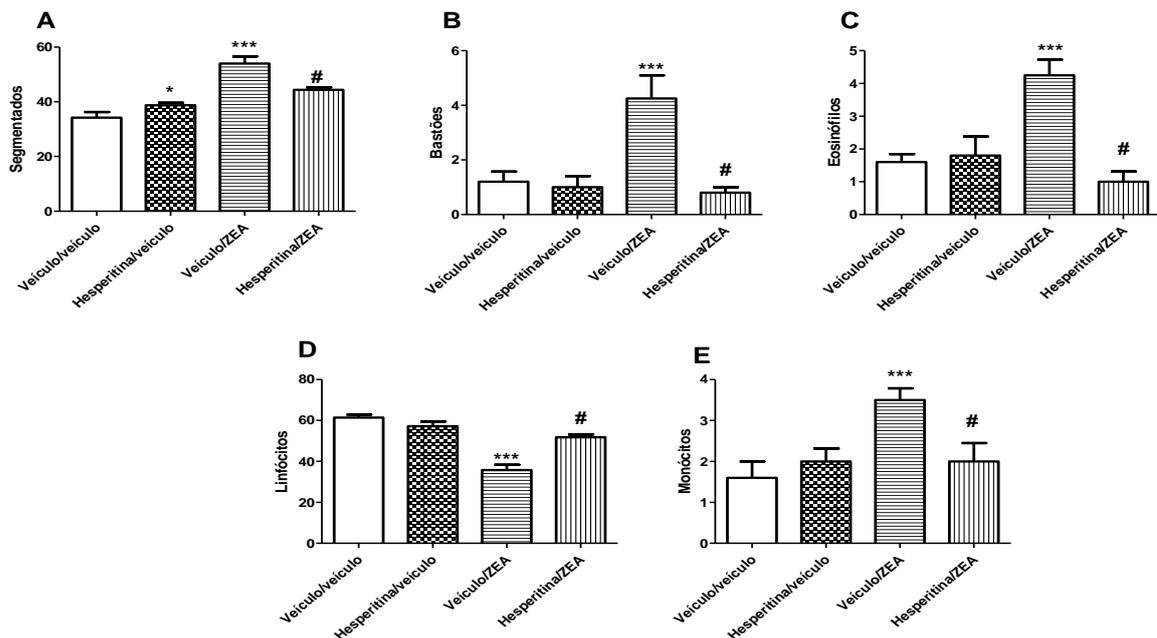
Figura 4 - Efeito da administração da hesperitina (25 mg/kg, p.o.) e da ZEA (40 mg/kg, p.o.) na concentração de hemoglobina corpuscular principal (A), hemoglobina corpuscular principal (B) e volume corpuscular principal (C) no sangue dos camundongos. Os dados são demonstrados através de média \pm erro padrão para um número=5 animais por grupo. *** indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/veículo. # indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/ZEA.



O tratamento com a ZEA aumentou significativamente o número de leucócitos totais e suas frações (bastões, segmentados, eosinófilos e monócitos), enquanto que a HT agiu de modo preventivo (Fig. 5). Em um trabalho similar, o licopeno, um importante antioxidante, foi capaz de prevenir as alterações provocadas pela ZEA nas mesmas células sanguíneas analisadas.¹⁶

Ainda, verificou-se que semelhante ao estrogênio, a ZEA, pode modular grande parte das respostas imunitárias e prejudicar órgãos linfoides, resultando na atrofia do timo e assim na diminuição na produção de linfócitos.¹⁷ Quanto à diminuição de linfócitos, a mesma reforça a capacidade imunossupressora desta micotoxina e corrobora com os resultados de outros estudos.^{18,19}

Figura 5 - Efeito da administração da hesperitina (25 mg/kg, p.o.) e da ZEA (40 mg/kg, p.o.) no número de segmentados (A), bastões (B), eosinófilos (C), linfócitos (D) e monócitos (E) no sangue dos camundongos. Os dados são demonstrados através de média \pm erro padrão para um número=5 animais por grupo. *** indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/veículo. * indica uma diferença significativa ($p < 0.05$) comparada ao grupo veículo/veículo. # indica uma diferença significativa ($p < 0.001$) comparada ao grupo veículo/ZEA.



O tratamento com a hesperitina se mostrou benéfico, pois foi capaz de impedir os efeitos que a ZEA provoca nos parâmetros hematológicos, com possível envolvimento de propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias deste flavonoide.

CONCLUSÃO

Diante do exposto, podemos concluir que a ZEA induziu hematotoxicidade e que a HT, através de suas propriedades, atuou como preventivo nos eventos tóxicos induzidos pela ZEA. Assim, os resultados obtidos comprovam a eficiência do efeito protetor que o flavonóide hesperitina tem frente os danos hematológicos que a zearalenona provoca no organismo. Os dados obtidos neste trabalho reforçam a importância dos flavonoides como antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011. **Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos**. Brasília, DF, Brasil, 2011.
- SANTIN, E. **Mould growth and mycotoxin production**. The Mycotoxin Blue Book. Nottingham: Nottingham University Press, 2005. p. 225-234.

3. GRENIER, B., OSWALD, I. Mycotoxin co-contamination of food and feed: meta-analysis of publications describing toxicological interactions. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 3, p. 285-313, 2011.
4. GROMADZKA, K., WASKIEWICZ, A., CHELKOWSKI, J., & GOLINSKI, P. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. **World Mycotoxin Journal**, v.1, n. 2, p. 209-220, 2008.
5. BOEIRA, S.P. **Caracterização de efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxina zearalenona em camundongos**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana. 2012.
6. MIDDLETON, E., KANDASWAMI, C., THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.
7. GARG, A., GARG, S., ZANEVELD, L.J.D., & SINGLA, A. K. Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 655-669, 2001.
8. SHOKRZADEH, M., AHMADI, A., RAMEZANINEJHAD, S., & SHADBOORESTAN, A. Hesperidin, a Citrus Bioflavonoid, Ameliorates Genotoxicity-induced by Diazinon in Human Blood Lymphocytes. **BMC Pharmacology**, p. 1-8, 2015.
9. CONKOVÁ, E. LACIAKOVA, A., KOVÁČ, G., SEIDEL, H. Review: Fusarial toxins and their role in animal diseases. **The Veterinary Journal**, v.165, p.214– 220, 2003.
10. ABBÈS, S.; OUNES, Z.; BEN SALAH-ABBÈS, J.; HOUAS, Z., OUESLATI, R., BACHA, H., OTHMAN, O. The protective effect of hydrated sodium calcium aluminosilicate against haematological, biochemical and pathological changes induced by zearalenone in mice. **Toxicon**, v. 47, p. 567–574, 2006.
11. MAAROUFI, K., CHEKIR, L., CREPPY, E.E., ELLOUZ, F., BACHA, H. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. **Toxicon**, v. 34, p. 535-540, 1996.
12. SALAH-ABBE'S, J., ABBE'S, S., HOUAS, Z., ABDEL-WAHHAB, M. A., OUESLATI, R. Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of Radish extract (*Raphanus Sativus*). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1–10, 2008.
13. WAITZBERG, D. L. **Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 279-94.
14. DILKIN, P. ZORZETE, P., MALLMANN, C.A., GOMES, J. D. F., UTIYAMA, C. E., OETTING, L. L., CORREA, B. Toxicological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1345-1353, 2003.
15. SALAH-ABBES, J. B., ABBÈS, S., ABDEL-WAHHAB, M. A., OUESLATI, R.. *Raphanus sativus* extract protects against ZEN-induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. **Toxicon**, v. 53, p 525-533, 2009.
16. BOEIRA, S.P., FILHO, C.B., DEL'FABRO, L., ROMAN, S. S., ROYES, L. F. F., FIGHERA, M. R., FURIAN, A. F. Lycopene treatment prevents hematological, reproductive and histopathological damage induced by acute zearalenone administration in male Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**. p.179–185, 2015.

17. HUEZA, I. M., RASPANTINI, P. C. F., RASPANTINI, L. E. R., LATORRE, A. O., GÓRNIAK, S. L. Zearalenone, an estrogenic mycotoxin, is an immunotoxic compound. **Toxins**, v. 6, n. 3, p. 1080-1095, 2014.
18. CHATTOPADHYAY, S., DEBNATH, U. Emergent universe in the chameleon, $f(R)$ and $f(T)$ gravity theories. **International Journal of Modern Physics D**, v. 20, p. 1135-1152, 2011.
19. MEKKAWY, I. A., MAHMOUD, U. M., SAYED, A. E. H. Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Tissue and cell**, v. 43, n. 4, p. 223-229, 2011.

ANEXO I



Instruções aos autores

Revista Clínica Veterinária / Redação
Rua dr. José Elias 222 CEP 05083-030
São Paulo - SP
cvredacao@editoraguara.com.br

Indexações:

ISI Web of Knowledge - Zoological Record
Latindex
CAB Abstracts

Artigos científicos inéditos, como trabalhos de pesquisa, revisões de literatura e relatos de caso, enviados à redação são avaliados pela equipe editorial. Em face do parecer inicial, o material é encaminhado aos consultores científicos. A equipe decidirá sobre a conveniência da publicação, de forma integral ou parcial, encaminhando ao autor sugestões e possíveis correções.

Relatos de casos são utilizados para apresentação de casos de interesse, quer seja pela raridade, evolução inusitada ou técnicas especiais, que são discutidas detalhadamente.

Revisões são utilizadas para o estudo aprofundado de informações atuais referentes a um determinado assunto, a partir da análise criteriosa dos trabalhos de pesquisadores de todo o meio científico, publicados em periódicos de qualidade. Uma revisão deve apresentar no máximo até 15% de seu conteúdo provenientes de livros e no máximo 20% de artigos com mais de dez anos de publicação.

Trabalhos de pesquisa são utilizados para apresentar resultados, discussões e conclusões de pesquisadores que exploram fenômenos ainda não completamente conhecidos ou estudados. Nesses trabalhos, o bem-estar animal deve sempre receber atenção especial.

Para a primeira avaliação, os autores devem enviar pela internet (cvredacao@editoraguara.com.br) um arquivo texto (.doc) com o trabalho, acompanhado de imagens digitalizadas em formato .jpg. As imagens digitalizadas devem ter, no mínimo, resolução de 300 dpi na largura de 9cm. Se os autores não possuírem imagens digitalizadas, devem encaminhar pelo correio ao nosso departamento de redação cópias das imagens originais (fotos, slides ou ilustrações – acompanhadas de identificação de propriedade e autor). Devem ser enviadas também a identificação de todos os autores do trabalho (nome completo por extenso, RG, CPF, endereço residencial com cep, telefones e e-mail). Além dos nomes completos, devem ser informadas as instituições às quais os autores estejam vinculados, bem como seus títulos no momento em que o trabalho foi escrito.

Todos os artigos, independentemente da sua categoria, devem ser redigidos em língua portuguesa e acompanhados de versões em língua inglesa e espanhola de: título, resumo (de 700 a

800 caracteres) e unitermos (3 a 6). Os títulos devem ser claros e ser grafados em letras minúsculas – somente a primeira letra da primeira palavra deve ser grafada em letra maiúscula. Os resumos devem ressaltar o objetivo, o método, os resultados e as conclusões, de forma concisa, dos pontos relevantes do trabalho apresentado. Os unitermos não devem constar do título. Devem ser dispostos do mais abrangente para o mais específico (eg, "cães, cirurgias, abscessos, próstata). Verificar se os unitermos escolhidos constam dos "Descritores em Ciências de Saúde" da Bireme (<http://decs.bvs.br/>). Revisões de literatura não devem apresentar o subtítulo "Conclusões". Sugere-se "Considerações finais".

Não há especificação para a quantidade de páginas, dependendo esta do conteúdo explorado. Os assuntos devem ser abordados com objetividade e clareza, visando o público leitor – o clínico veterinário de pequenos animais.

Utilizar fonte arial tamanho 10, espaço simples e uma única coluna. As margens superior, inferior e laterais devem apresentar até 3cm. Não deixar linhas em branco ao longo do texto, entre títulos, após subtítulos e entre as referências.

No caso de todo o material ser remetido pelo correio, devem necessariamente ser enviados, além de uma apresentação impressa, uma cópia em CD-rom.

Imagens como fotos, tabelas, gráficos e ilustrações não podem ser cópias da literatura, mesmo que seja indicada a fonte. Devem ser utilizadas imagens originais dos próprios autores. Imagens fotográficas devem possuir indicação do fotógrafo e proprietário; e quando cedidas por terceiros, deverão ser obrigatoriamente acompanhadas de autorização para publicação e cessão de direitos para a Editora Guará (fornecida pela Editora Guará). Quadros, tabelas, fotos, desenhos, gráficos deverão ser denominados figuras e numerados por ordem de aparecimento das respectivas chamadas no texto. Imagens de microscopia devem ser sempre acompanhadas de barra de tamanho e nas legendas devem constar as objetivas utilizadas.

Evitar citar comentários que constem das introduções de trabalhos de pesquisa para não incorrer em apud. Procurar se restringir ao "Material e

métodos" e às "Conclusões" dos trabalhos. Sempre buscar pelas referências originais consultadas por esses autores.

As referências serão indicadas ao longo do texto apenas por números sobrescritos ao texto, que corresponderão à listagem ao final do artigo – autores e datas não devem ser citados no texto. Esses números sobrescritos devem ser dispostos em ordem crescente, seguindo a ordem de aparecimento no texto, e separados apenas por vírgulas (sem espaços). Quando houver mais de dois números em sequência, utilizar apenas hífen (-) entre o primeiro e o último dessa sequência, por exemplo cão^{1,2,3,4,5}. A apresentação das referências ao final do artigo deve seguir as normas atuais da ABNT 2002 (NBR 10520). Utilizar o formato v. para volume, n. para número e p. para página. Não utilizar "et al" – todos os autores devem ser relacionados. Não abreviar títulos de periódicos. Sempre utilizar as edições atuais de livros – edições anteriores não devem ser utilizadas. De modo geral, não serão aceitos apud, somente sendo utilizados para literatura não localizada e obras antigas de difícil acesso. As citações de obras da internet devem seguir o mesmo procedimento das citações em papel, apenas com o acréscimo das seguintes informações: "Disponível em: <<http://www.xxxxxx>>. Acesso em: dia de mês de ano." Somente utilizar o local de publicação de periódicos para títulos com incidência em locais distintos, como, por exemplo: Revista de Saúde Pública, São Paulo e Revista de Saúde Pública, Rio de Janeiro. De modo geral, não são aceitas como fontes de referência periódicos ou sites não indexados.

Não utilizar SID, BID e outros. Escrever por extenso "a cada 12 horas", "a cada 6 horas" etc.

Com relação aos princípios éticos da experimentação animal, os autores deverão considerar as normas do SBCAL (Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório).

Informações referentes a produtos utilizados no trabalho devem ser apresentadas em rodapé, com chamada no texto com letra sobrescrita ao princípio ativo ou produto. No rodapé deve constar o nome comercial, fabricante, cidade e estado. Para produtos importados, informar também o país de origem, o nome do importador/distribuidor, cidade e estado.