

**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

NEICÍ CÁCERES SILVA

**EFEITO PROTETOR DO GAMA ORIZANOL SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA
POR ZEARALENONA NO SISTEMA REPRODUTOR DE CAMUNDONGOS
MACHOS**

Uruguaiiana – RS, Brasil.

2017

NEICÍ CÁCERES SILVA

**EFEITO PROTETOR DO GAMA ORIZANOL SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA
POR ZEARALENONA NO SISTEMA REPRODUTOR DE CAMUNDONGOS
MACHOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica**.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Uruguaiiana – RS, Brasil.

2017

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).

CSI586e CACERES SILVA, NEICÍ

EFEITO PROTETOR DO GAMA ORIZANOL SOBRE A TOXICIDADE
INDUZIDA POR ZEARALENONA NO SISTEMA REPRODUTOR DE CAMUNDONGOS
MACHOS / NEICÍ CACERES

SILVA. 66 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, 2017.

"Orientação: CRISTIANO RICARDO JESSE".

1. Micotoxina. 2. Gama Orizanol. 3. Testosterona.
4. Inflamação. I. Título.

NEICÍ CÁ CERES SILVA

**EFEITO PROTETOR DO GAMA ORIZANOL SOBRE A TOXICIDADE INDUZIDA
POR ZEARALENONA NO SISTEMA REPRODUTOR DE CAMUNDONGOS
MACHOS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto Sensu em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica**.

Área de concentração: Bioquímica toxicológica

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de fevereiro de 2017.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse
Orientador
(UNIPAMPA)



Profa. Dra. Simone NoreMBERG KUNZ
(UNIPAMPA)



Dr. Carlos Borges Filho
(UNIPAMPA)

Dedico ao melhor de tudo o que temos: '*nossa família*', por
entenderem a nossa ausência em momentos que não
voltam mais...

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”. (Simone de Beauvoir)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter iluminado esta vitória!

A minha esposa Márcia Rósula, ela é a luz de nossos caminhos, por entender os momentos de ausência, sempre apoiando, com seu carinho, seu exemplo de esforço, dedicação e superação...

Ao Cristhian Matheus e Bruno, filhos que amamos e são nossa razão de tudo... que compreenderam nossos momentos de ausência;

Ao meu pai, minha mãe e meus irmãos, pelos mesmos motivos acima...;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse, pela amizade, incentivo, ensinamento e apoio.

A UNIPAMPA, ao Laftambio, a JOSAPAR e a todos os colegas, aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica pela oportunidade e o ensinamento (seminários, aulas), em fim, a todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

A Zearalenona (ZEA) é uma micotoxina que causa toxicidade, produzida por fungos pertencentes ao gênero *fusarium* encontrada em grãos e cereais. O Gama Orizanol (γ -ORY) é uma mistura de ésteres do ácido ferúlico com esterol e álcoois triterpênicos, sendo encontrado no óleo do farelo de arroz bruto, com propriedades antioxidantes. O objetivo deste estudo foi verificar a ação do γ -ORY frente aos efeitos tóxicos da micotoxina ZEA em camundongos adultos machos. Os camundongos receberam γ -ORY (10 e 50 mg/Kg, via gavagem) durante 10 dias antes de uma única administração oral de ZEA (40 mg/Kg, via gavagem). Depois de 48 h os testículos e o sangue foram coletados. O γ -ORY impediu a redução no número e na motilidade dos espermatozóides e dos níveis de testosterona, restaurou as defesas antioxidantes e reduziu o processo de inflamação, indicando um efeito protetor nos danos induzidos por ZEA no tecido testicular. A ZEA causou uma diminuição na atividade de defesas antioxidantes, levando a exaustão através das atividades enzimáticas (glutaciona peroxidase, glutaciona redutase, glutaciona-S-transferase), depleção dos níveis de glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG), aumento dos níveis de 4-hidroxinonenal e 8 hidroxí-2'-desoxiguanosina. Em relação aos parâmetros inflamatórios no tecido testicular após a administração da ZEA, houve um aumento no fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e nos níveis de interleucinas IL-1 β e IL-6 e uma redução nos níveis de IL-10. Os nossos resultados demonstraram que o γ -ORY atenuou os efeitos tóxicos causados por ZEA no sistema reprodutor e no sangue de camundongos, provavelmente pela modulação do estresse oxidativo, resultando em uma redução do processo inflamatório. Com base no exposto acima, espera-se que o estudo com γ -ORY possa ser utilizado em contribuição a novas terapias.

Palavras-chave: Micotoxina. Gama Orizanol. Testosterona. Inflamação.

ABSTRACT

Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by fungi belonging to the genus *Fusarium* found in grains and cereals. The Gamma Oryzanol (γ -ORY) is a mixture of ferulic acid esters with sterol and triterpenic alcohols, being found in crude rice bran oil with antioxidant properties. The objective of this study was to verify the action of γ -ORY against the toxic effects of mycotoxin ZEA in male adult mice. The mice received γ -ORY (10 and 50 mg/kg, via gavage) for 10 days prior to a single oral administration of ZEA (40 mg/kg, via gavage). After 48 h the testes and blood were collected. The γ -ORY prevented the reduction in sperm number and motility and testosterone levels, restored antioxidant defenses, and reduced the inflammation process, indicating a protective effect on ZEA induced damage in testicular tissue. ZEA caused a decrease in the activity of antioxidant defenses, leading to exhaustion through enzymatic activities (glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione-S-transferase), depletion of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) levels, Levels of 4-hydroxynonenal and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. Regarding inflammatory parameters in the testicular tissue after ZEA administration, there was an increase in tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin levels IL-1 β and IL-6 and a reduction in IL-10 levels. Our results demonstrated that γ -ORY attenuated the toxic effects caused by ZEA in the reproductive system and in the blood of mice, probably by the modulation of the oxidative stress, resulting in a reduction of the inflammatory process. Based on the above, it is expected that the study with γ -ORY can be used in contribution to new therapies.

Keywords: Mycotoxin. Gamma Oryzanol. Testosterone. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

A) Revisão Bibliográfica

Figura 1 – Fungos dos gêneros: <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i>	19
Figura 2 – Estruturas químicas e vias metabólicas da ZEA e dos seus metabolitos.....	24
Figura 3 – Estrutura química da Zearalenona (ZEA).....	25
Figura 4 – Estrutura química do Gama Orizanol (γ -ORY)	27
Figura 5 – Estruturas químicas de quatro componentes principais de γ -ORY.....	29

B) Manuscrito científico

Figure 1. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on (A) number of spermatozoa in epididymis (F (2,30) = 1.70; p<0.20), (B) percentage of motile spermatozoa (F (2,30) = 8.12; p<0.001), (C) plasmatic levels of testosterone (F (2,18) = 12.03; p<0.0001) and (D) testis weight (F (2,24) = 4.79; p<0.01). Data are mean \pm S.E.M. for n = 6 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

Figure 2. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on serum levels of IL-1 β (2A) (F (2,18) = 47.03; p<0.0001), IL- 6 (2B) (F (2,18) = 25.14; p<0.0001), IL-10 (2C) (F (2,18) = 7.40; p< 0.004) and TNF- α (2D) (F (2,18) = 100.96; p<0.0001). Data are mean \pm S.E.M. for n = 7 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

Figure 3. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on levels of 4-HNE (3A) (F (2,24) = 27.65; p<0.0001), 8-OHdG (3B) (F (2,24) = 48.31; p<0.0001) and protein carbonyl (3C) (F (2,24) = 19.60; p<0.0001). Data are mean \pm S.E.M. for n = 6 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

LISTA DE TABELAS

Manuscrito Científico

Table 1. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg / kg, po) on the activity of antioxidant enzymes (GPx, GR, GST, CAT and SOD) in testes of male mice exposed to ZEA (40 mg / kg, p.o.).

Table 2. Effect of γ -ORY on levels of non-enzymatic antioxidants (GSH, GSSG and ratio GSH/GSSG) in testis of male mice exposed to ZEA (40 mg/kg, p.o.).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE =	4-Hidroxinonenol
8-OHdG =	8-Hidroxi-2'-Desoxiguanosina
AESA =	Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos
ANOVA =	Analysis of variance (análise de variância)
AOAC =	Association of Official Analytical Chemists (Associação de Químicos Analíticos Oficiais)
CAT =	Catalase
CEN =	European Committee for Standardization (Comite Europeu de Normalização)
DNA =	Ácido Desoxirribonucleico
EFSA =	Europe Food Safety Authority (Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos)
FAO =	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)
GPx =	Glutathione Peroxidase
GR =	Glutathione Redutase
GSH =	Glutathione Reduzida
GSSG =	Glutathione Oxidada
H ₂ O ₂ =	Peróxido de Hidrogênio
HSD =	Hematoma Subdural
IL =	Interleucina
IL-1 =	Interleucina 1
IL-10 =	interleucina 10
IL-1 α =	Interleucina 1-alfa
IL-1 β =	Interleucina 1-beta
IL-6 =	Interleucina 6
JECFA =	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (Comite Misto FAO / OMS de Peritos em Aditivos Alimentares)
MERCOSUL =	Mercado Comum do Sul
NPSH =	Tióis Não Protéicos
O ₂ =	Oxigênio
OMS =	Organização Mundial da Saúde

RNA =	Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)
RBO =	Rice Brain Oil (óleo de farelo de arroz)
SOD =	Superóxido Dismutase
SOSBAI =	Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado
TBARS =	Thiobarbituric Acid Reactive Substances (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico)
TNF =	Tumor Necrosis Factor (fator de necrose tumoral)
TNF- α =	Fator de Necrose Tumoral Alfa
UE =	União Europeia
ZAN =	Zearalanona
ZEA =	Zearalenona
α -ZAL =	Alfa Zearalanol
α -ZEL =	Alfa Zearalenol
β -ZAL =	Beta Zearalanol
β -ZEL =	Beta Zearalenol
γ -ORY =	Gama Orizanol
IU =	Unidades Internacionais
HCl =	Ácido clorídrico
CDNB =	1-chloro-2,4-dinitrobenzene

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. JUSTIFICATIVA	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral	18
3.2. Objetivos específicos	18
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
4.1. Contaminação fúngica	19
4.2. Micotoxinas	20
4.2.1. Formação de contaminação por micotoxinas	20
4.2.2. Controle da contaminação	21
4.2.3. Efeito tóxico das micotoxinas	21
4.2.4. Legislação e regulamentação sobre micotoxinas	22
4.3. Zearalenona (ZEA)	23
4.3.1. Metabolismo da (ZEA)	24
4.3.2. Estrutura e características químicas da (ZEA)	25
4.3.3. Ocorrência	26
4.3.4. Ação biológica da (ZEA)	26
4.3.5. Toxicidade da (ZEA).....	26
4.4. Gama Orizanol (γ-ORY)	27
4.4.1. Características da principal matéria-prima de obtenção do γ -ORY	28
4.4.2. Distribuição do γ -ORY em arroz	28
4.4.3. Efeitos do γ -ORY	28
5. MANUSCRITO CIENTÍFICO	31
1. INTRODUCTION	34
2. MATERIALS AND METHODS	35
2.1. Animals	35
2.2. Reagents	35
2.3. Experimental draw	35
2.4. Preparation of tissue	36
2.5. Enzyme assays	36

2.5.1. Superoxide dismutase (SOD) activity	36
2.5.2. Glutathione peroxidase (GPx) activity	36
2.5.3. Glutathione S-transferase (GST) activity	37
2.5.4. Catalase (CAT) activity	37
2.5.5. Glutathione Reductase (GR) activity	37
2.6. Fluorometric assay of reduced glutathione (GSH) and oxidized (GSSG)	38
2.7. Measurement of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)	38
2.8. Evaluation of the number and motility of spermatozoa	38
2.9. Testosterone levels	39
2.10. Levels (IL-1β, IL-6, IL-10 and TNF-α)	39
2.11. Protein Determination	39
2.12. Assay protein carbonyl	39
2.13. Statistical analysis	39
3. RESULTS	39
3.1. Activities antioxidant enzymes (GPx, GR, GST, CAT and SOD)	39
3.2. Non-enzymatic antioxidant levels (GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio)	40
3.3. Measurement of 4-HNE levels of 8-OHdG and protein carbonyl	40
3.4. Reproductive parameters	40
3.5. Inflammatory parameters	41
4. DISCUSSION	41
5. REFERÊNCIAS	45
Legends:	51
Figures:	52
Tables:	55
6. CONCLUSÃO	57
7. PERSPECTIVAS	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9. ANEXOS	66
9.1. Anexo 1 – Protocolo de aprovação de projeto CEUA – UNIPAMPA	66

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos, de uma maneira geral, são muito propensos a contaminação por fungos, uma vez que são constituídos de substâncias orgânicas e inúmeros nutrientes. É inevitável que, segundo certas condições ambientais, ocorra formação de bolores (CONCON, 1988). Em alimentos, a contaminação por micotoxinas pode ocorrer a qualquer momento, durante a colheita ou armazenamento (LOFTUS et al., 2016).

Há mais de 150 espécies de fungos que podem se desenvolver em um grande número de substratos destinados tanto à alimentação humana quanto animal. Estudos a respeito de moléstias que se manifestam em animais de criação alimentados com rações contaminadas, levaram à conclusão de que os agentes causadores não eram propriamente os fungos, mas sim substâncias originadas de seu metabolismo secundário, denominadas micotoxinas (MÍDIO & MARTINS, 2000).

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO) estimou que 25% do suprimento alimentar está contaminado com micotoxinas (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2015).

A micotoxina Zearalenona (ZEA) é uma lactona do ácido resorcílico com atividade estrogênica (ABASSI et al., 2016) tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MALI et al., 2016) e promotora de crescimento (anabólica). A ZEA é capaz de promover proliferação, formação de colônias e migração celular. A ZEA possui capacidade de causar danos ao DNA, o que sugere que esta micotoxina pode ser considerada como cancerígena (ABASSI et al., 2016).

Em animais, os efeitos tóxicos da exposição prolongada à ZEA na dieta incluem carcinogenicidade, genotoxicidade, toxicidade reprodutiva, efeitos endócrinos e imunotoxicidade. Em homens, a ZEA pode reduzir os níveis de testosterona, o peso e espermatogênese, induzindo a feminização e redução do libido (ZINEDINE et al., 2007).

O dano oxidativo é provavelmente considerado como uma das principais vias de toxicidade da ZEA. Este dano oxidativo pode, portanto, ser um evento iniciador e contribuir em parte, ao mecanismo da ZEA em diferentes efeitos genotóxicos e citotóxicos (ASSEN et al., 2007).

Segundo Varela & Forte (2001) citocinas são moléculas protéicas, glicosiladas ou não, que enviam diversos sinais estimulatórios, modulatórios ou mesmo inibitórios para as diferentes células próximas e endócrinas quando sua ação é a distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antígena.

Os grãos são os alimentos básicos mais comuns consumidos em todo o mundo. Tendo em vista que o arroz (*Oryza Sativa* L.) constitui o principal grão na dieta humana, e uma vez que alimenta mais de metade da população mundial, é muito importante considerar os seus constituintes, tais como γ -ORY, fibras, ácido aminobutírico e vitaminas (TUNCEL & YILMAS, 2011). Atualmente, o arroz é a cultura com maior potencial de aumento de produção e responde pelo suprimento de 20% de calorias consumidas na alimentação de pessoas no mundo (SOSBAI, 2016).

Os efeitos benéficos atribuídos ao consumo de arroz integral devem considerar a interação sinérgica dos constituintes bioativos. O consumo de arroz não polido (integral) em refeições regulares é fortemente recomendado, uma vez que durante o processo industrial de polimento para obtenção do arroz branco, ocorre a redução de aproximadamente 94% do teor de γ -ORY do grão (TUNCEL & YILMAS, 2011). Em decorrência de seu consumo, o arroz desempenha um papel estratégico na solução de questões de segurança alimentar. Os dez países maiores produtores são, em ordem decrescente: China, Índia, Indonésia, Bangladesh, Vietnã, Tailândia, Myanmar, Filipinas, Brasil e Japão (SOSBAI, 2016).

Para estabelecer os efeitos benéficos do Gama Orizanol (γ -ORY) na defesa antioxidante dos sistemas celulares, é importante considerar que os antioxidantes dietéticos são essenciais para manter as funções celulares normais e para assegurar a homeostase do corpo. No entanto, a regulação de um mecanismo redox através de meios dietéticos está atualmente ganhando uma atração considerável no campo das ciências da saúde e de alimentos (MINATEL et al., 2016).

2. JUSTIFICATIVA

A exposição humana às micotoxinas pelo consumo de alimentos é uma questão de saúde pública em todo o mundo. Visando novas estratégias para intervenções terapêuticas ao dano causado pela micotoxina ZEA no sistema reprodutor masculino, faz-se necessário a investigação de novos compostos que possuam atividade anti-inflamatória, antioxidante, anticancerígeno, entre outros. Existe uma relação entre o estresse oxidativo e as alterações reprodutivas causadas pela micotoxina ZEA e investigar o uso de novas substâncias naturais como o γ -ORY a fim de atuar como agente protetor, torna esse estudo relevante.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar o possível efeito protetor do γ -ORY contra a toxicidade induzida pela ZEA no sistema reprodutor e sanguíneo de camundongos machos.

3.2. Objetivos específicos

Analisar a toxicidade da ZEA e um possível efeito protetor do γ -ORY no sistema reprodutor.

Determinar os níveis plasmáticos de testosterona.

Determinar a toxicidade da ZEA e um possível efeito protetor do γ -ORY nos parâmetros inflamatórios: (IL-1 β , IL-6 e IL-10, TNF- α) em sistema reprodutor.

Determinar os marcadores enzimáticos: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona-S-transferase (GST).

Avaliar os marcadores não enzimáticos como: a glutaciona reduzida (GSH) e glutaciona oxidada (GSSG) e 4-hidroxinonenal (4-HNE).

Quantificar os níveis de 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8-OHdG).

Analisar o teor de proteína carbonila.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Contaminação fúngica

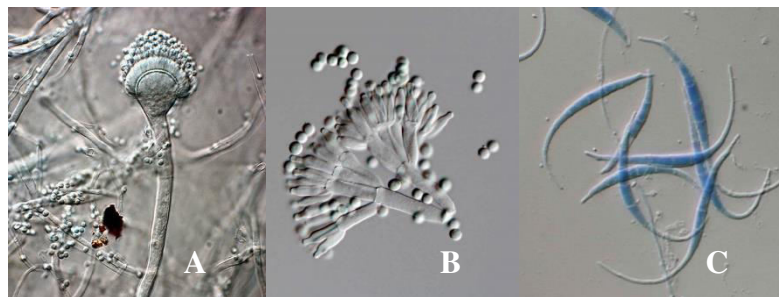
Durante muitos anos, a contaminação dos alimentos e rações de animais por diferentes espécies de fungos não patogênicos foi considerada apenas como um problema sensorial e, eventualmente, econômico. Algumas décadas atrás, a idéia a respeito de alimentos com bolor era de que os fungos presentes produziam apenas substâncias degradáveis a sua aparência, sabor ou odor e que poderiam gerar no máximo, problemas relacionados a rejeição destes alimentos (CAZENAVE & MÍDIO, 1998).

Os metabólitos primários dos fungos ou como de outros organismos, são aqueles essenciais ao seu crescimento. Já os secundários são formados durante o final da fase exponencial de crescimento e não possuem uma significância aparente para o crescimento ou metabolismo do organismo produtor. Em geral, esses metabólitos parecem ser formados quando grandes quantidades de precursores de metabólitos primários, tais como aminoácidos, acetato, piruvato e outros, são acumulados. A síntese de micotoxinas representa uma maneira dos fungos reduzirem quantidade de precursores, que não são requeridos para o metabolismo (JAY, 2005).

Metabolismo secundário é compreendido como reações bioquímicas cujos produtos da síntese terminal não desempenham papel algum na própria biologia do fungo produtor. A produção de metabólitos secundários depende enormemente das características das espécies dos fungos, condições ambientais (nutrientes, parâmetros físico-químicos), além do estado bioquímico e biológico do substrato (LE BARS & LE BARS, 1998).

As micotoxinas são produzidas principalmente por três gêneros de fungos: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* conforme demonstrado na figura 1.

Figura 1 – Fungos dos gêneros: *Aspergillus* (a), *Penicillium* (b), *Fusarium* (c).



Fonte: Google imagens (acesso em 19.fev.2017)

4.2. Micotoxinas

As micotoxinas são os metabólitos secundários tóxicos de ocorrência natural de algumas espécies de fungos. Elas são contaminantes alimentares e comprovadamente apresentam efeitos prejudiciais para a saúde humana e animal (MARROQUÍN-CARDONA et al., 2015).

As micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou a ração, se torna contaminado por um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas. Sabe-se que a maioria dos alimentos e rações pode permitir o crescimento e o desenvolvimento de fungos toxigênicos, tanto durante a produção, quanto durante o processamento, o transporte e o armazenamento (FRISVAD & SAMSON, 1992).

As micotoxinas podem aparecer na cadeia alimentar devido à infecção fúngica das culturas, sendo consumida diretamente pelos seres humanos ou utilizadas como alimento para os animais (MÍDIO & MARTINS, 2000).

4.2.1. Formação de contaminação por micotoxinas

Geralmente, as culturas que são armazenadas por algum período, se tornam alvos potenciais para o crescimento de fungos e formação de micotoxinas. A contaminação humana por micotoxinas pode ocorrer em uma variedade de plantas utilizadas como alimento, incluindo commodities tais como: grãos de cereais (cevada, milho, centeio e trigo), café, produtos lácteos, frutas, nozes, amendoim e especiarias. A contaminação também pode ocorrer por produtos animais como o leite ou pela carne de animais que consomem alimentos contaminados (STOEV, 2015).

As condições climáticas dos países tropicais (como a temperatura e umidade elevadas) favorecem a proliferação de fungos nos produtos agrícolas, principalmente grãos, determinando altos teores de micotoxinas nos alimentos provenientes dessas regiões. Isso pode acarretar dificuldades na exportação desses produtos com sérios reflexos a economia dos países que, a exemplo do Brasil, mantém o equilíbrio de sua balança comercial baseado na exportação de grandes quantidades de grãos (CAZENAVE & MIDIO, 1998).

Segundo Concon (1988), os fungos produtores de micotoxinas podem ser classificados em três grupos:

- Fungos de campo: geralmente contaminam as plantas antes mesmo das colheitas;
- Fungos de armazenamento: se desenvolvem durante o período de armazenamento;
- Fungos de decomposição: que como o próprio nome sugere, levam o alimento a um estado de decomposição, tornando-o impróprio para o consumo.

A principal forma dos seres humanos ficarem expostos às micotoxinas é através do consumo de alimentos contaminados como: grãos, milho e outros gêneros alimentícios ou, alternativamente, consumindo carne de animais ou produtos de origem animal que tenham ingerido alimentos contaminados (STOEV, 2015). A qualidade da matéria-prima destinada para transformação em alimentos, é um ponto crucial para que sejam possíveis assegurar os níveis de exposição humana (BOL et al., 2016).

4.2.2. Controle da contaminação

Os processos de alta temperatura causam redução das concentrações de micotoxinas, mas a maioria das micotoxinas são moderadamente estáveis na maioria dos sistemas de processamento de alimentos. O processo por extrusão a altas temperaturas (acima de 150 °C) parecem reduzir as concentrações de micotoxinas (BULLERMAN & BIANCHINI, 2007). A ZEA é estável ao calor até 150 °C, sendo observada degradação somente em altas temperaturas ou em condições alcalinas (RYU et al., 1999).

A avaliação do perigo e exposição, respectivamente, são os dois primeiros fatores que fornecem informações para as principais bases de avaliação dos riscos (EGMOND et al., 2007).

Geralmente, a ZEA não é afetada no processo de cozimento, foi observado mais de 40% de redução apenas em condições alcalinas ou durante o processo de extrusão com aquecimento sob um elevado grau de pressão (EFSA, 2011).

4.2.3. Efeito tóxico das micotoxinas

Um grande número de fungos produz substâncias tóxicas conhecidas como micotoxinas, algumas dessas substâncias possuem capacidade mutagênica e carcinogênica, enquanto outras apresentam toxicidade específica a um órgão ou são tóxicas por outros

mecanismos. Ao menos 14 micotoxinas são carcinogênicas, sendo as aflatoxinas as mais potentes. Os ensaios microbiológicos com as micotoxinas revelaram um nível de 85% de correlação entre carcinogenicidade e mutagenicidade (STARK, 1980).

As micotoxinas contaminam alimentos e rações animais, produzindo efeitos agudos (micotoxicoses) ou crônicos, via de regra, carcinogênicos (MÍDIO & MARTINS, 2000). As características de diagnóstico que definem as micotoxicoses são as seguintes: a doença não é transmissível, os tratamentos com fármacos e antibióticos têm pouco ou nenhum efeito, os focos são frequentemente sazonais, os surtos são geralmente associados à gêneros alimentícios e o exame do alimento ou gênero alimentício suspeito muitas vezes revela sinais de atividade fúngica (MARIN et al., 2013).

4.2.4. Legislação e regulamentação sobre micotoxinas

No início das regulamentações para micotoxinas, as medidas abrangeram principalmente as aflatoxinas e foram estabelecidas por países industrializados, que tinham os seus limites e orientação (SCHULLER et al., 1983).

Até o final dos anos 90, as definições para regulamentações de micotoxinas foi principalmente um caso nacional. Gradualmente, várias comunidades como a União Européia – UE, Mercado Comum do Sul – MERCOSUL e países como Austrália e Nova Zelândia têm padronizado suas regulamentações sobre micotoxinas existentes (EGMOND et al., 2007).

Segundo a FAO (2003) o conhecimento de que as micotoxinas poderiam ter sérios efeitos sobre os seres humanos e os animais, levaram muitos países nas últimas décadas a estabelecer regulamentações sobre as micotoxinas nos alimentos para proteger a saúde dos seres humanos, bem como, os interesses econômicos dos produtores e comerciantes. O estabelecimento de regulamentos em micotoxinas é uma atividade complexa, que envolve muitos fatores e partes interessadas. Os primeiros limites para micotoxinas foram estabelecidos no final dos anos 1960 para as aflatoxinas. Até ao final de 2003, cerca de 100 países haviam desenvolvido limites específicos para as micotoxinas nos gêneros alimentícios e nos alimentos para animais e esses números continuavam aumentando. A mais recente revisão abrangente sobre micotoxinas foi publicada pela FAO em 1997 com base em um inquérito internacional realizado em 1994 e 1995. Desde a publicação deste documento, muitos novos limites e regulamentos para micotoxinas entraram em vigor ou estão em desenvolvimento, criando a necessidade de uma atualização. Em 2002 e 2003, realizou-se um

inquérito internacional relevante, que forneceu informações muito pormenorizadas. Estas informações foram processadas e analisadas durante 2003 e foram atualizadas com base em informações e alterações recebidas até 31 de dezembro de 2003. As regulamentações são feitas principalmente com base em efeitos tóxicos conhecidos.

As micotoxinas consideradas mais significativas são as aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisinas, zearalenona e alguns tricotecenos incluindo o desoxinivalenol e tiveram seus riscos avaliados pelo Comitê Misto de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) e pelo órgão consultivo científico da FAO e da OMS.

O JECFA fornece um mecanismo para avaliar a toxicidade de aditivos alimentares, resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes. Avaliação de segurança de contaminantes incorpora várias etapas em uma abordagem formal de avaliação do risco à saúde.

As regulamentações atuais foram elaboradas com base em pareceres científicos de autoridades como: o Comitê Misto de Peritos da FAO/OMS, JECFA e a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (AESA). Ao mesmo tempo, os requisitos para métodos analíticos e amostras adequadas, colocam altas exigências a outras organizações profissionais, como a AOAC Internacional e a Norma Europeia (CEN). Os regulamentos atuais abrangem 13 diferentes micotoxinas ou grupos de micotoxinas e foram estabelecidos os limites para muitos alimentos, commodities e produtos (EGMOND et al., 2007).

4.3. Zearalenona (ZEA)

A micotoxina ZEA foi isolada e caracterizada em 1962, devido a chamada síndrome estrogênica produzida em suínos alimentados com rações à base de milho contaminado por este fungo. Os limites para a ZEA no milho e outros cereais variam atualmente de 100 a 600 µg/kg (CAZENAVE & MIDIO, 1988). A concentração da ZEA nos alimentos para o consumo humano e animal difere dependendo da condição climática. A média de ZEA através de diferentes dietas de alimentação, variam de 2,4 a 24 ng/kg por dia em adultos. Entretanto, a ingestão de ZEA aumenta entre 9,3 e 100 ng/kg por dia em pessoas mais jovens (ZATECKA et al., 2014).

A ZEA é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Fusarium*, particularmente por *Fusarium graminearum* e também por *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides*, e *F. incarnatum*. Geralmente, estas espécies de *Fusarium* crescem e invadem

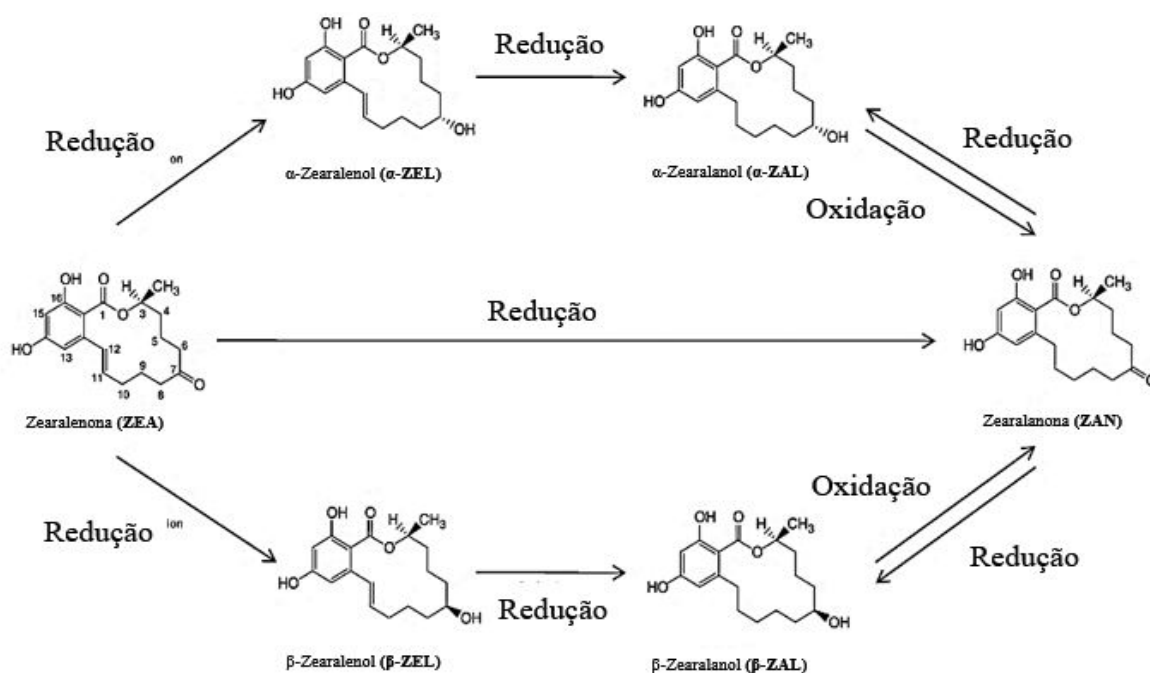
em condições de campo fresco úmido durante a floração, mas a produção de toxinas também pode ocorrer após a colheita em condições de armazenamento precárias (EFSA, 2011).

4.3.1. Metabolismo da (ZEA)

As espécies de ZEAs podem produzir pequenas quantidades de vários metabolitos relacionados, o α -zearalenol e o β -zearalenol são os derivados mais importantes (RICHARDSON et al., 1985). Todas as ZEAs são compostos estrogênicos, e o potencial estrogênico do α -zearalenol é maior do que a ZEA e β -zearalenol (HAGLER et al., 1979), provavelmente devido a uma maior afinidade de ligação aos receptores de estrogênio (FITZPATRICK et al., 1989).

As hidroxisteróide desidrogenases (HSD) convertem a ZEA por 7-cetona reduzindo em dois metabolitos estereoisoméricos α - e β -zearalenol (α -ZEL e β -ZEL). Uma redução adicional da via que produz dois metabolitos menores α - e β -zearalanol (α -ZAL e β -ZAL). Outra via envolve a redução da ZEA a zearalanona (ZAN) que pode ser adicionalmente reduzido a α -ZAL e β -ZAL (MALEKINEJAD et al., 2006). Variações na estrutura original da ZEA, principalmente em termos da hidroxilação e oxidação, podem levar naturalmente ao aparecimento de outros compostos, conforme demonstrado na figura 2.

Figura 2 – Estruturas químicas e vias metabólicas da ZEA e dos seus metabolitos.



Fonte: Adaptado de Molina-Molina, 2014.

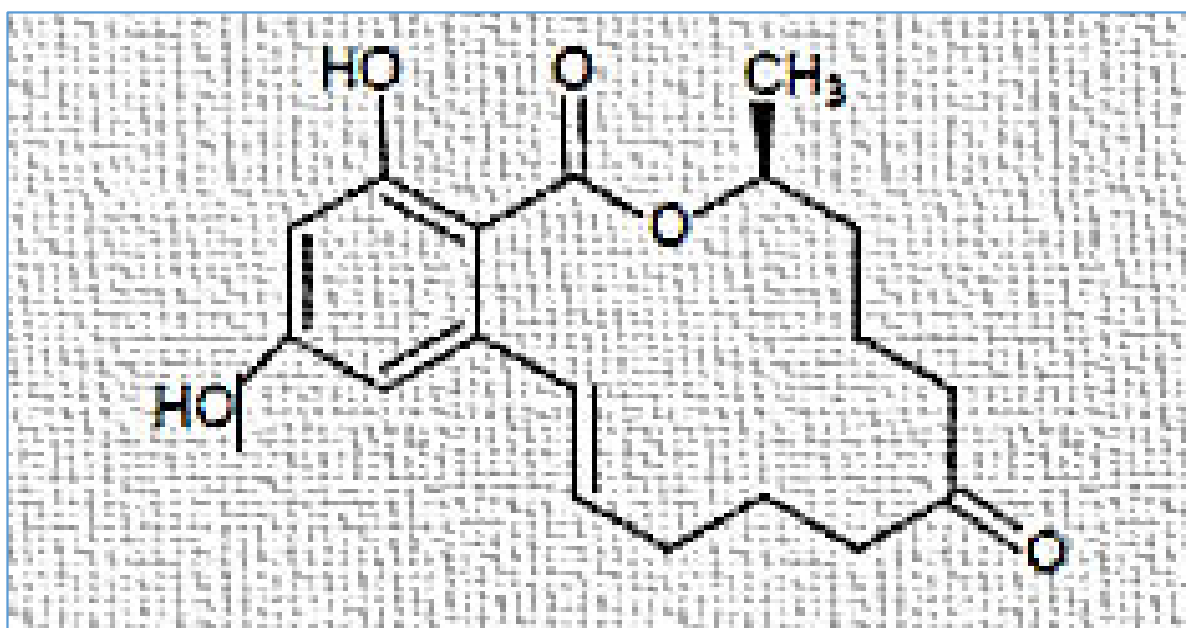
4.3.2. Estrutura e características químicas da (ZEA)

A ZEA está estruturalmente relacionada com o zearalanol (zeranol), um promotor de crescimento anabólico proibido na UE em 1988. A ZEA é metabolizada em bovinos para vários compostos, incluindo zearanol. Na síntese do β -zearanol utilizado em veterinária como promotor do crescimento, a ZEA aparece como produto intermediário (CHRISTENSEN et al., 1965; IARC, 1983).

A ZEA é uma lactona macro cíclica do ácido resorcílico, apresentando-se como substância muito estável à hidrólise. Sua propriedade fluorescente pode ser usada como uma vantagem analítica quando for irradiada com luz ultravioleta. A ZEA caracteristicamente é uma substância de origem natural. Todavia, pode ser obtida por síntese a partir da glicose, em larga escala (CHRISTENSEN et al., 1965; IARC, 1983).

Apesar da ZEA (figura 3) ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, é estável ao rompimento hidrolítico. Isto é atribuído à presença de um grupo metil secundário que impede que ataques nucleofílicos sejam efetivados na carbonila da lactona. A ZEA é um sólido cristalino branco, solúvel em álcali-aquoso, éter, benzeno, clorofórmio, cloreto de metila, acetato de etila, acetonitrila, álcoois e fracamente solúvel em éter de petróleo (OGA, 2008).

Figura 3 – Estrutura química da Zearalenona (ZEA).



4.3.3. Ocorrência

De acordo com a EFSA (2011), entre os grãos para consumo humano, a frequência de ocorrência de ZEA no milho (33%) e nível de conteúdo médio (15 µg/kg) é significativamente maior. Esta tendência foi mantida em produtos de moagem de grãos, embora níveis muito altos fossem determinados em farelo de trigo (33 µg/kg). Assim, tanto a prevalência e nível de ZEA nos produtos de cereais analisados para consumo foi baixo, exceto para óleos vegetais com 86% de amostras positivas e um nível médio de 72 µg/kg. Em geral, a ZEA é redistribuída entre as frações de moagem. Os subprodutos da limpeza dos grãos de cereais crus (poeira, cascas, e outros) foram caracterizados por concentrações de ZEA 3 a 30 vezes maiores que grãos de cereais limpos, enquanto que no farelo as concentrações foram 2 vezes mais elevadas. A ZEA foi encontrada em milho, cevada, aveia, trigo e sorgo, sendo o milho o grão mais relacionado com surtos de hiperestrogenismo em suínos (OGA, 2008). Se os níveis de umidade permanecem suficientemente altos após a colheita, o fungo cresce e produz toxina. Outros grãos como gergelim, podem ser infectados, além do milho (STARK, 1980).

4.3.4. Ação biológica da (ZEA)

A ação biológica dessa toxina está relacionada a sua capacidade de competir com o receptor específico de união do estradiol, nas células brancas. Além disso, estimula a síntese de DNA, RNA e proteínas nos órgãos (útero e glândulas mamárias). Esta micotoxina possui atividade estrogênica, tanto nos machos como nas fêmeas (OGA, 2008). A ZEA é rapidamente metabolizada após a ingestão e absorção, principalmente por células hepáticas e intestinais (MALEKINEJAD et al., 2006).

A ZEA é principalmente metabolizada pela via de desintoxicação, e seus metabolitos reduzidos são então conjugados com ácido sulfônico ou glucurônico, seguido de uma excreção biliar extensa e recirculação entero-hepática, e são finalmente eliminados, principalmente na urina (ZINEDINE et al., 2007; DUCA et al., 2012).

4.3.5. Toxicidade da (ZEA)

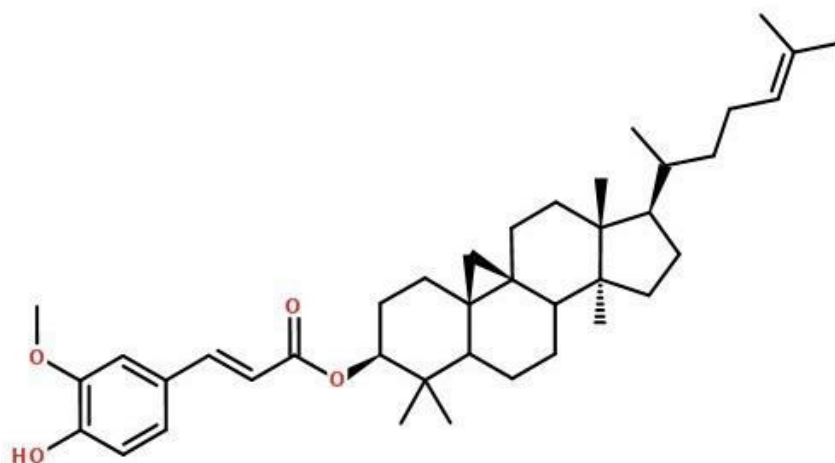
A ZEA e alguns dos seus metabólitos relacionados, se liga a receptores de estrogênio. Assim, a toxicidade está associada à determinadas espécies de animais e possivelmente nos seres humanos (GROMADZKA et al., 2009, WOOD, 1992).

Poucos dados estão disponíveis sobre a toxicidade aguda da ZEA, parece ser relativamente baixa, com valores de DL50 oral variando entre 2000 e 20.000 mg/kg, dependendo das espécies testadas (D'MELLO, 1991). A ZEA possui efeitos graves sobre a produção animal durante a gravidez, reduz a sobrevivência e o peso do embrião. Além disso, a ZEA produz dilatação vulvar e vermelhidão, vulvovaginite, retenção ou ausência de leite e prolapso retal (ZINEDINE et al., 2007).

4.4. Gama Orizanol (γ -ORY)

O γ -ORY (figura 4) é uma mistura de esteril ferulatos, que são formados por esterificação do grupo hidroxilo de esteróis (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol) ou álcoois triterpeno (cicloartanol, cicloestol, 24-metilenocicloaranol, ciclobranol) com o grupo ácido carboxílico de ácido ferúlico (IMSANGUAN et al., 2008; LU et al., 2011; JENG et al., 2012). O γ -ORY foi encontrado em óleo de farelo de arroz em 1954 (KANEKO & TSUCHIYA, 1954).

Figura 4 – Estrutura química do gama orizanol (γ -ORY).



As moléculas com atividade antioxidante contidos no arroz incluem ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas, proantocianidinas, tocoferóis, tocotrienóis, γ -ORY e ácido fítico. Os três primeiros grupos são referidos coletivamente como compostos fenólicos (GOLFO & TRINDADE, 2014).

4.4.1. Características da principal matéria-prima de obtenção do γ -ORY

O arroz é uma das principais culturas cerealíferas do mundo em desenvolvimento. É consumido como alimento básico por mais de um terço da população mundial com aproximadamente 95% da produção na Ásia (BHATTACHARJEE et al., 2002).

O processo de moagem começa com a remoção da casca não comestível que cobre o grão, produzindo assim o grão inteiro (ou arroz integral). O endosperma de arroz, também conhecido como arroz branqueado, arroz polido ou arroz branco, é produzido por um processo adicional de polimento que tira a camada de farelo do arroz integral. Em geral, o benefício do endosperma do grão de arroz permanecer sobre o grão inteiro é devido às suas propriedades sensoriais desejáveis e a estabilidade de armazenamento. A camada de farelo é constituída por (pericarpo, casca da semente, nucellus e aleurona) e o germe (embrião). O farelo de arroz, o embrião e a casca são considerados subprodutos da indústria de moagem de arroz (GOLFO & TRINDADE, 2014).

4.4.2. Distribuição do γ -ORY em arroz

Independentemente da cor do arroz, a distribuição de γ -ORY no arroz é classificada na seguinte ordem decrescente: farelo (3.174,2 - 3.176,4 mg/kg) > grão integral (413,3 - 473,3 mg/kg) > casca (102,4 - 323,2 mg/kg) > endosperma (49,1 - 231,8 mg/kg) (GOLFO & TRINDADE, 2014). O farelo de arroz possui 3000 mg / kg de γ -ORY, que é uma mistura de 10 ésteres ferúlicos de álcool triterpênico (XU & GODBER, 1999; LLOYD et al., 2000).

Os ésteres de esteril ferulados que compõem o γ -ORY são encontrados predominantemente no farelo de arroz (YU et al., 2007; HUANG & NG, 2011; TUNCEL & YILMAZ, 2011; MANDAK & NYSTROM, 2012). O óleo de arroz (obtido através do seu farelo) é extraído do germe e de parte interna da casca do arroz e é rico em γ -ORY (PATEL & NAIK., 2004 ; TUNCEL et al., 2011).

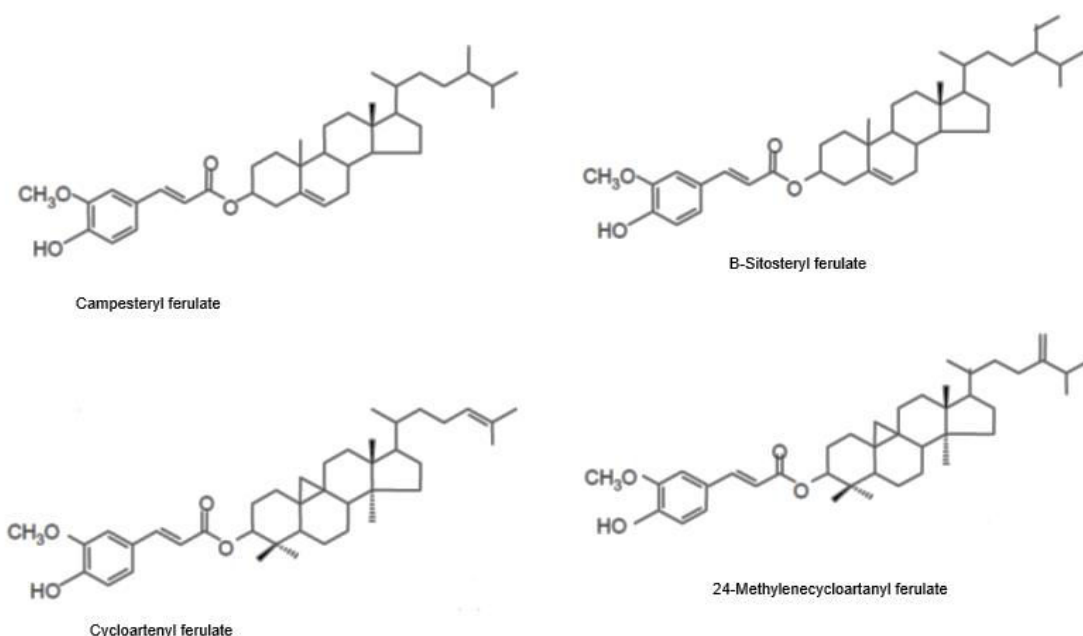
4.4.3. Efeitos do γ -ORY

O γ -ORY caracteriza-se por apresentar atividades hipocolesterolêmicas (CHEN & CHENG, 2006), anti-inflamatórias (PASCUAL et al., 2013) e antioxidantes (ISMAIL et al., 2010; PASCUAL et al., 2013). O γ -ORY compreende uma mistura de ésteres de ácido

ferúlico (FA) e fitoesteróis (esteróis e álcoois triterpênicos) (XU & GODBER, 1999; LERMA-GARCÍA et al., 2009).

No entanto, o efeito principal do γ -ORY como um antioxidante é provavelmente devido à sua capacidade de prevenir a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo. Essa propriedade antioxidante deve-se aos seus três metabólitos (cicloartenilo, 24-metilenecicloartanilo e campesteril ferulados), conforme demonstrado na figura 5 que apresentaram maior teor de contra a oxidação do colesterol quando comparado com a vitamina E (XU et al., 2001), seu principal metabólito o ácido ferúlico apresenta o grupo $\text{CH} = \text{CH-COOH}$ (ácido cinâmico) que assegura atividade antioxidante eficiente (CUVELIER et al., 1992).

Figura 5 – Estruturas químicas de quatro componentes principais de γ -ORY.



Portanto, todos os potenciais benefícios para a saúde associados à ingestão de γ -ORY devem ser interpretados a sua capacidade antioxidante e outras interações metabólicas (MINATEL et al., 2016). Xu & Godber (2001) sugeriram que a função nutricional dos componentes do γ -ORY pode estar relacionada às suas funções antioxidantes devido à estrutura do ácido ferúlico. Uma vez que existem várias maneiras pelas quais uma substância pode exercer a sua atividade antioxidante, Juliano et al. (2005) avaliou o mecanismo antioxidante do γ -ORY com diferentes modelos *in vitro*. Poucos ensaios *in vivo* avaliaram o potencial antioxidante do γ -ORY. O estudo de Accinni et al. (2006) demonstrou as vantagens

de uma suplementação dietética combinada de 4 meses com ácido graxo poliinsaturado ômega 3, vitamina E, niacina e γ -ORY em níveis de estresse oxidativo em pacientes dislipidêmicos. Entre os três grupos experimentais, o grupo que consumiu γ -ORY apresentou as melhores taxas de estresse oxidativo expressas por: ROS, interleucina 1- β (IL1- β), concentração de fator de necrose tumoral (TNF- α) e tromboxano B2 (TXB2) e capacidade antioxidante total (TAC). Em um estudo de Ismail et al. (2010), foram determinadas as propriedades antioxidantes de γ -ORY na expressão gênica em fígado de ratos. Em outro estudo de SZCZESNIAK et al. (2015) foi demonstrado que o γ -ORY é um poderoso antioxidante, enquanto que os resultados *in vitro* sugerem que γ -ORY é capaz de inibir a formação de novos radicais livres, bem como eliminar os radicais orgânicos solúveis em lipídeos.

5. MANUSCRITO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de manuscrito científico. Os itens *Materiais e Métodos*, *Resultados*, *Discussão* e *Referências Bibliográficas*, encontram-se no próprio manuscrito científico. O **manuscrito** está disposto na forma que será submetido a revista “Reproductive Toxicology”.

**PROTECTIVE EFFECT OF GAMMA ORYZANOL ON ZEARALENONE-INDUCED
TOXICITY IN THE MALE MOUSE REPRODUCTIVE SYSTEM**

Neicí Cáceres Silva^a, Márcia Rósula Poetini^a, Vandrezza Cardozo Bortolotto^a, Cristiano
Ricardo Jesse^{a,b*}

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

^bDepartment of Nutrition, UNIPAMPA- Campus Itaqui, RS, Brazil

*Corresponding author at: Laboratório de Avaliações Farmacológicas e Toxicológicas Aplicadas às Moléculas Bioativas – LaftamBio Pampa. CEP 97.650-000 Itaqui, RS, Brazil. Tel.: +55-55-3433-1669.

E-mail addresses: Cristianoricardojesse@gmail.com (C. Jesse)

ABSTRACT

The Zearalenone (ZEA) is a mycotoxin produced by fungi of the genus *Fusarium* found in grains and cereals. The Gamma Oryzanol (γ -ORY) is a mixture of ferulic acid esters of sterol and triterpenic alcohols, found in the crude rice bran oil. The aim of this study was to investigate the action of γ -ORY forward to the toxic effects of the mycotoxin ZEA in adult male mice. The mice received γ -ORY (10 and 50 mg / kg, via gavage) for 10 days before a single oral administration of ZEA (40 mg / kg, via gavage). After 48 h the testes and blood were collected. The γ -ORY prevented the reduction in the number and motility of sperm and testosterone levels, indicating a protective effect on the damage induced by ZEA in testicular tissue. ZEA caused a decrease in the antioxidant defense activity, leading to exhaust through the enzymatic activity (glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase), reduced glutathione levels depletion (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), increased 4-hydroxynonenal levels and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. With respect to inflammation, an increase in the levels of interleukin 1 β and 6, tumor necrosis factor and a reduction of IL-10 levels in testis tissue after administration ZEA. The γ -ORY treatment increased the number and motility of sperm, testosterone levels by restoring the antioxidant defenses and reduced the process of inflammation. Our results indicate that the γ -ORY attenuate the toxic effects caused by ZEA in reproductive systems and blood of mice.

Keywords: Mycotoxin, Gamma Oryzanol, testosterone, inflammation.

1. INTRODUCTION

Contamination of food by mycotoxins has been reported worldwide, especially in foods susceptible to fungal growth, such as grains and cereals [6]. The risks associated with mycotoxins depend on both danger and exposure. Exposure is variable due to different levels of contamination and eating habits in various parts of the world [7]. Mycotoxins, which usually occur in cereal grains and other products, are not completely destroyed during food processing operations, which can lead to contamination of processed and finished foods. The mycotoxins most commonly associated with cereal grains are *aflatoxins*, *ochratoxin A*, *fumonisin*s, deoxynivalenol and zearalenone [8]. Mycotoxins are secondary metabolites produced by a variety of fungi, the genera of fungi most commonly associated with naturally occurring toxins are *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* [9].

Zearalenone (6- (10-Hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)- β -resorcylic acid lactone) (ZEA) is a mycotoxin produced by several species of *Fusarium*, particularly by *Fusarium graminearum* and *F. culmorum*, *F. Cerealis*, *F. equiseti*, *F. verticillioides* and *F. incarnatum* [11]. ZEA is a mycotoxin with high estrogenic, non-steroidal activity, *in vitro* and *in vivo*, and can act as a general food contaminant. It is normally detected in grains such as corn, wheat, barley, sorghum, rye and other cereals [12]. ZEA is rapidly transformed in the liver to α and β -zearalenol by 3-dehydrogenase α -hydroxysteroids [13].

ZEA is capable of promoting cell proliferation, colony formation and cell migration, even at very low concentrations. ZEA induces toxicity, being important its prevention, attenuation and the cure of its harmful effects induced in human health [14]. In the present study, it was found that maize grain is the most susceptible to contamination by phytopathogenic fungi of the genus *Fusarium* [15]. Geographic factors, variety susceptibility and storage conditions also interfere with mycotoxin production, and several toxins can be produced simultaneously [16]. One of ZEA's main toxicity targets is the reproductive system (uterus, ovaries and testicles) in the human body and animals, and can cause some problems, such as fibrosis in the uterus, breast cancer, decreased fertility and in some cases, can cause problems in hematological parameters [17].

The Gamma Oryzanol (γ -ORY) consists of a complex mixture of ferulic acid esters with triterpene alcohols and sterols, being an important nutraceutical found in rice bran [1]. Several biological and physiological properties have been associated with the γ -ORY, such as the ability to lower cholesterol, antioxidant and anti-inflammatory activities [2, 3, 4]. These

compounds are found in cereal grain germ and bran and are the three main bioactive chemical compounds found in brown rice, thus being a good material for the development of functional foods and nutraceuticals [5]. The advantages in the consumption of brown rice for health are largely associated with the bioactive components present in foods, in the presence of ferulic acid (FA), γ -ORY and Gamma-aminobutyric acid (GABA).

The objective of the present study was to investigate the protective potential of the γ -ORY range against ZEA toxicity in sperm number and motility, evaluating plasma levels of testosterone, interleukins (IL-1 β , IL-6, IL-10) and necrosis factor alpha (GSH levels, oxidized glutathione (GSSG), 4-hydroxynonenal (4-HNE), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST)), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD)) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) in the testicular tissue in adult male mice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Animals

The present study used male type Swiss mice (25-30 g). The animals were maintained under controlled temperature of 22 °C to 25 °C, with free access to food and water, under a light-dark cycle of 12 h/12h. All experiments were performed in order to minimize the suffering of animals and reduce the number of animals used in the study. The procedures in this study will be conducted in accordance with the guidelines of the Resources Committee on Care and Use of Experimental Animals and will be submitted for approval by the Ethics Committee for Animal Use (CEUA), the Federal University of Pampa, Brazil. The project is filed under the number 021/2014.

2.2. Reagents

The ZEA will be purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and Gamma Oryzanol range of chemical industry of Tokyo Co., Ltd. (Tokyo, Japan).

2.3. Experimental draw

The mice are weighed and randomly divided into six groups (n = 6 per group): 1) control/vehicle; 2) vehicle/ γ -ORY 10 mg/kg; 3) Vehicle/ γ -ORY 50 mg/kg; 4) ZEA (40 mg / kg); 5) γ -ORY 10 mg/kg + ZEA (40 mg/kg); 6) γ -ORY 50 mg/kg + ZEA (40 mg/kg). The vehicle is canola oil (the γ -ORY and ZEA be diluted canola oil), where γ -ORY (10 and 50 mg / kg) is administered for 10 consecutive days. The concentration of the γ -ORY used in this study was according to SPIAZZI et al. (2013) and the ZEA concentration and the duration of the experiment, according to PETERINI-BOEIRA et al. (2012; 2014 and 2015).

The mice receive the eleventh day ZEA (40 mg/kg), or ZEA/vehicle. After 48 hours, euthanasia will be performed with a pentobarbital injection (180 mg/kg intraperitoneally, ip), are subsequently collected tissues (testis and epididymis) and blood samples collected by cardiac puncture in tubes containing heparin (1 U/ml), these tissues are removed, weighed and homogenized in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4 for determination of enzyme indicators of oxidative stress.

2.4. Preparation of tissue

After the experimental period, mice were euthanized with an overdose of barbiturates (intraperitoneal sodium pentobarbital 180 mg/kg). The testis, epididymis tissue and blood were collected and subsequently homogenized after collection in Tris-HCl 50 mM pH 7.4. Homogenates were centrifuged at 2400 g for 15 minutes at 4 °C and the supernatant fraction was used for the subsequent tests.

2.5. Enzyme assays

2.5.1. Superoxide dismutase (SOD) activity

The activity of superoxide dismutase will be described second [18]. This method is based on the ability of SOD to inhibit the autoxidation of epinephrine. The color reaction can be monitored at 480 nm. An enzyme unit (1 U) is defined as the amount of enzyme required to inhibit the auto-oxidation rate of 50% at 26 °C.

2.5.2. Glutathione peroxidase (GPx) activity

The activity of glutathione peroxidase (GPx) is measured in a system containing reduced glutathione (GSH), the reduced form of nicotinamide adenine phosphate dinucleotide (NADPH) and glutathione reductase (GR) according [19]. GPx acts as oxidizing GSH to glutathione disulfide (GSSG). To complete the cycle, GR reduce GSSG to GSH back to the expense of NADPH. The decrease in NADPH concentration can be monitored at 340 nm. The GPx activity will be expressed by the use of NADPH in nmol/min/mg of protein.

2.5.3. Glutathione S-transferase (GST) activity

The GST activity is assayed spectrophotometrically at 340 nm according to a previously described method [20]. The reaction mixture will contain an aliquot of homogenate, 0.1 M potassium phosphate buffer pH 7.4, 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which is used as a substrate. The enzymatic activity is expressed in $\mu\text{mol}/\text{min mg}$ of protein.

2.5.4. Catalase (CAT) activity

The CAT activity in the samples will be assayed spectrophotometrically as described [21], enzyme is involved in the control of disappearing of H_2O_2 in the presence of the sample at 240 nm. Subsequently an aliquot is added in potassium phosphate buffer 50 mM pH 7.0 and the enzyme reaction is started by adding H_2O_2 . One unit of enzyme is defined as the amount of enzyme required to monitor the disappearance of H_2O_2 . The enzymatic activity is expressed as units (U) / mg protein (1 U decomposes 1 μmol of H_2O_2 / min at pH 7, 25 ° C).

2.5.5. Glutathione Reductase (GR) activity

The GR activity will be determined as described by Mannervik and Carlberg [22]. In this assay, GSSG is reduced to GR consumption at the expense of NADPH, which is followed at 340 nm. The GR activity is proportional to the NADPH decay. An aliquot S1 is added to the system buffer containing 0.15 M potassium phosphate (pH 7.0), 1.5 mM EDTA and 0.15 mM NADPH. Subsequently reading the basal substrate (20 mM GSSG) to be added. The enzymatic activity is expressed as nmol of NADPH min/ mg of protein.

2.6. Fluorometric assay of reduced glutathione (GSH) and oxidized (GSSG)

For measuring the levels of GSH and GSSG it will be used a method previously described by HISSIN and HILF [23]. Briefly, 100 mg of testis are homogenized in 3.75 ml EDTA phosphate buffer (pH 8) plus 1 ml HPO₃ (25%). Homogenates are centrifuged at 4 ° C at 100,000 x g for 30 min, and the supernatants (S2) are separated in two different 500 ml aliquots each for measurement of GSH and GSSG. For the measurement of GSH, 500 ml of supernatant (S2) is diluted in 4.5 ml of phosphate-EDTA buffer (pH 8) (sodium phosphate 100 mM and 5 mM EDTA). The final assay mixture (2.0 ml) contains 100 ml of the diluted supernatant tissue, 1,800 ml of phosphate-EDTA buffer and 100 ml of Oftalaldehyde (OPA) (1 mg / ml). The mixtures are incubated at room temperature for 15 min and their fluorescent signal will be recorded on the Agilent spectrofluorimeter at 420 nm and emission at 350 nm excitation wavelength. For the measurement of GSSG, 250 ml of supernatant (S2) is incubated at room temperature with 100 ml of N-ethylmaleimide (NEM) (0.04 M) for 30 min at room temperature, and thereafter, 140 µL of mixture, 1.760 ml NaOH buffer (0.1 N) are added in sequence OPT are added 100 µL and incubated for 15 minutes, using the procedure described above for the assay of GSH.

2.7. Measurement of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)

The 4-HNE and 8-OHdG content will be measured in the testis with ELISA kits according to the manufacturer's instructions (Cell Bio Labs, SanDiego, USA). The results are expressed in g / ml (4-HNE) and ng / ml (8-OHdG).

2.8. Evaluation of the number and motility of spermatozoa

The assessment of the sperm counts and motility is performed according [24]. Briefly, epididymis tail is homogenized in 2 ml of saline (0.9% NaCl) heated (37 ° C). An aliquot (10 uL) of the diluted sperm suspension is transferred to a standard hemocytometer counting chamber is subsequently allowed to stand for 5 min. The cells will be installed within 5 min and will be counted with the help of light microscope (Nikon Eclipse 50i) with 200x magnification.

2.9. Testosterone levels

The serum testosterone levels are analyzed by radioimmunoassay (RIA) using commercially available reagent (total testosterone, Coat-a-Count®, DPC, Los Angeles, CA, USA) with a labeled hormone I (radioactive tracer). Radioactivity will be measured by an automatic counter for determining the standard curve and the concentration of the samples. The results will be expressed one ng/ml serum.

2.10. Levels (IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α)

The second blood sample will be used for the determination of serum inflammatory following parameters: IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α . IL-1 β levels of IL-6, IL-10 and TNF- α assays are determined using commercially available ELISA according to the instructions provided by the manufacturer (Duo Set kit, R and D Systems; Minneapolis, USA). The results are expressed in pg/mg tissue.

2.11. Protein Determination

Protein concentration is measured by the method of Bradford [25] using bovine serum albumin as standard.

2.12. Assay protein carbonyl

2.13. Statistical analysis

For the statistical analysis, will be used (ANOVA) two-way followed by the post hoc Newman-Keuls using the Graph Pad Prism version 5.0 software, where significance levels will be set at $p < 0.05$. The results are expressed as mean and standard deviation.

3. RESULTS

3.1. Activities antioxidant enzymes (GPx, GR, GST, CAT and SOD)

In our study was to evaluate the antioxidant enzymes of oxidative stress induced by acute administration of ZEA and the protective effect of γ -ORY (Table 1). In ZEA group there was a reduction in the activity of GPx, GR and GST in testis, being prevented by exposure to γ -ORY at the doses of 10 and 50 mg/kg by the oral route. However, the activity of SOD and CAT was no significant difference in any of the exposure groups (Table 1).

3.2. Non-enzymatic antioxidant levels (GSH, GSSG and GSH/GSSG ratio)

Effect of γ -ORY on levels of non-enzymatic antioxidants (GSH, GSSG ratio and GSH/GSSG) in testis of male mice exposed to ZEA (Table 2). In the group exposed to ZEA there was a reduction in the levels of GSH and GSH/GSSG ratio compared with the control group, and mitigated the damage induced by ZEA by treatment with γ -ORY at the doses of 10 and 50 mg/kg by the oral route. However, in the group treated with ZEA showed an increase in the levels of GSSG in the control group, which prevented this rise with the treatment of γ -ORY, promoting a reduction per se.

3.3. Measurement of 4-HNE levels of 8-OHdG and protein carbonyl

As shown in Figure 3 A and B, there was an increase in the levels of 4-HNE and 8-OHdG in the testes of mice ZEA group. However, treatment with γ -ORY (10 and 50 mg/kg) reduced the levels of 4-HNE (Figure 3A) and 8-OHdG (Figure 3B) in testis compared ZEA group. The protein carbonyl content was increased levels in the group treated with ZEA, this damage is prevented in the group treated with γ -ORY (Figure 3C).

3.4. Reproductive parameters

In our study, there was a reduction in the number and motility of spermatozoa in the group with ZEA (figure 1 A and B), wherein the γ -ORY (at the doses of 10 and 50 mg/kg by the oral route) was able to prevent deleterious effects caused by ZEA on sperm count and motility.

Plasma levels of testosterone and testes weight (Figure 1 C and D) the group exposed to ZEA was decreased significantly compared with the control group. In the group exposed to

ZEA + γ -ORY showed an increase in testosterone levels and the weight of the testes in comparison with ZEA group.

3.5. Inflammatory parameters

Inflammatory parameters of IL-1 β (Figure 2A), IL-6 (Figure 2B), TNF- α (Figure 2D) were significantly increased in the group with ZEA When compared to control group.

In the group treated with ZEA IL-10 levels (Figure 2C) showed a reduction compared to the control group. The γ -ORY demonstrated prevention in inflammatory parameters compared to the control group.

4. DISCUSSION

The direct association between mycotoxins, inflammation and oxidative stress in the male reproductive system and the subsequent development of infertility constitute important issues in contemporary medicine. The integrity of the testicular tissue and the development of immunologic apoptosis and oxidative mechanisms are essential for preservation of reproductive capacity [26]. In the present study, we revealed that exposure of mice to ZEA resulted in a marked decrease in sperm count as well as motility with significant increases in the levels of interleukins (IL-1 β , IL-6 and TNF- α), accompanied with decrease in the serum testosterone levels and in the testicular GSH content, a marked inhibition of GPx, GR and GST activities. In this context, we demonstrated the protective effect of γ -ORY on reproductive, oxidative and inflammatory alterations induced by the mycotoxin ZEA in mice.

In the present study, acute administration of ZEA at 40 mg / kg caused damage to the male reproductive system by dramatically reducing the number and motility of live spermatozoa, as well as a reduction in testosterone levels, our results corroborate those found in the study of [16]. The treatment by γ -ORY attenuated the reduction of the number and motility of live spermatozoa, particularly the dose of 50 mg/kg. The levels of testosterone were restored in levels control by γ -ORY at both doses, similarly at [26] Spermatogenesis and testosterone biosynthesis are the major functions in the mammalian reproductive system [28].

This study demonstrated that γ -ORY protected the male reproductive system preventing the reduction of the number and motility of sperm beyond the maintenance of testosterone levels, probably trough by modulating oxidative stress and reduction the process of inflammation in the testis of mice.

The antioxidant enzymes act cooperatively at different sites in the metabolic pathway of free radicals to prevent oxidative damage [29]. GST activity is involved in this effect and semen contains significant amounts of this enzyme, which is important enzyme for sperm protection against oxidative stress [26]. GSH may also serve as a cofactor for a several drug-metabolizing enzymes (GST) where it is consumed, or for antioxidant enzymes (GPx) where it functions as a redox partner [30]. During oxidation, GSH forms a dimer, glutathione disulfide (GSSG), which, in turn, can be reduced by the enzyme GR at the expense of NADPH [31]. 4-HNE has been shown to be a key mediator in increasing neuronal vulnerability to oxidative insults [32]. Based on these results, we reported that ZEA (40 mg/kg) reduced the activities of some key enzymes antioxidants (GST, GR and GPx) and altered the normal state of non-enzymatic antioxidant defenses increasing levels of GSSG and 4-HNE and decreasing the levels of GSH and the ratio GSH/GSSG. Similar results were reported [16, 31, 32, 33]. It was suggested that the depletion of antioxidants induced by ZEA could be also one of the reasons for increased oxidative stress in the testis and modifications of endocrine and reproductive parameters [33, 16, 26]. We demonstrated that the γ -ORY (10 and 50 mg/kg) attenuated the state of oxidative stress and restored to normal levels the non-enzymatic parameters probably why be where as it has potent free radical scavenging properties, which are associated with the hydroxyl substitution in the fifth and seventh positions that directly sequesters free radicals [34, 4, 35, 36]. The γ -ORY has been reported to possess a wide range of therapeutically useful biological potential activity, including lowering cholesterol levels, inhibition of platelet aggregation and improvement in lipid standard, antioxidant, anticancerogenic, antidiabetic, antiulcer, neuroprotective and also has immunomodulatory action [37]. In this way, the beneficial effects of γ -ORY with improvement of antioxidant potential thereby normalized GSH and GSSG contents and GPx, GR and GST activities.

Inflammation is a physiological response aiming at defending the organism against injurious stimuli and initiating the healing process in order to restore tissue homeostasis [38]. Testicular macrophages secrete pro-inflammatory as well as anti-inflammatory cytokines [39]. The biological significance of these mediators for testicular function is unknown, but they appear to be involved in immunologic surveillance, immunoregulation, and tissue remodeling [40]. Inflammation is an important part of the immune pathogenesis and is a physiological response of the body to tissue injury, infection and stress [41]. Macrophages play key roles in providing immediate defense against foreign agents, testicular macrophages

secrete proinflammatory cytokines and anti-inflammatory [39]. The γ -ORY presented anti-inflammatory activity [42, 43, 44]. Lipid peroxidation is a well-established mechanism for cell injury in animal and is used as an indicator of oxidative stress in cells and tissues. It is possible that the γ -ORY penetrate through the cell membrane due to its property lipophilicity. Extracts of rice bran rich in γ -ORY act as a lipophilic radical scavenger, more effective than the hydrophilic radical having potent anti-inflammatory activity [44].

Macrophages have been implicated in inducing immunosuppression in the testis microenvironment, where the cytokines play a key role in testis immune regulation [45]. Cytokines are important in host defense, inflammatory response, and immune-mediated disease. Through of this study, determined the cytokine concentrations, we quantified markers of the inflammation process (IL-1 β , 6, 10, TNF- α), ZEA initiated inflammation process as already reported [46, 11, 33]. IL-1 β , IL-6 and TNF- α acted as pro-inflammatory cytokines while IL-10 is a master anti-inflammatory cytokine that encourages inflammatory resolution by blocking signals that initiate the synthesis of pro-inflammatory proteins [38]. We showed that ZEA treatment decreased levels of IL-10 and of IL-1 β , 6, TNF- α , being prevented this damage by treatment with γ -ORY. In the present study, it was determined that the concentrations of cytokines and quantitated markers of the inflammatory process (IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α), ZEA mycotoxin is able to initiate a process of inflammation as already reported [16, 26], IL-1 β , IL-6 and TNF- α acted as pro-inflammatory cytokines, while IL-10 is an anti-inflammatory master cytokine that stimulates the inflammatory Resolution blocking signals that initiate synthesis of pro-inflammatory proteins [38]. In our study, treatment with γ -ORY restored IL-10 and decreased levels of IL-1 β , IL- 6 and TNF- α . The γ -ORY had anti-inflammatory activities [44].

The present study suggests that there was a depletion of antioxidant enzymes ZEA induced, leading to increased oxidative stress in testicular tissue, causing changes in the reproductive and endocrine parameters [33, 16, 26]. In our study, we demonstrated that the γ -ORY (10 and 50 mg/kg) attenuated oxidative stress. The γ -ORY 50 mg/kg protect against testicular oxidative damage induced by cadmium in male mice [4].

TNF- α is produced principally by macrophages involved in systemic inflammation and a member of a group of cytokines that stimulate acute phase reaction [43]. TNF- α and IL-1 β are produced in the testis under normal physiological conditions and play a significant role in the maintenance of testicular function [51]. IL-6 and IL-6R might be involved in the pathogenesis of autoimmune orchitis, promoting inflammation and apoptosis testicular germ cells [52].

Conclusion

In conclusion, this study showed that ZEA treatment caused damage to the reproductive system in male mice, ZEA caused a reduction in the number and motility of sperm, testosterone levels decreased, induced testicular oxidative damage developing a process of inflammation. Our results suggest that treatment with γ -ORY had a protective effect against damage ZEA action, restoring testicular function, improving antioxidant defenses and inflammatory parameters.

5. REFERENCES

- [1] R. G. Bitencourt, W. A. Rammazzina Filho, J. T. Paula, T. T. Garmus, F. A. Cabral, **Solubility of γ -oryzanol in supercritical carbon dioxide and extraction from rice bran**, *The Journal of Supercritical Fluids*. 107 (2016) 196-200.
- [2] M. Ismail, G. Al-Naqeeb, W. A. A. Mamat, Z. Ahmad, **Gamma Oryzanol rich fraction regulates the expression of antioxidant and oxidative stress related genes in stressed rat's liver**, *Nutrition & metabolismo*. 7 (2010) 23.
- [3] T. Akihisa, K. Yasukawa, M. Yamaura, M. Ukiya, Y. Kimura, N. Shimizu, K. Arai, **Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (2000) 2313-2319.
- [4] C. C. Spiazzi, V. Manfredini, F. E. B. da Silva, É. M. Flores, A. P. Izaguirry, L. M. Vargas, F. W. Santos, **Gamma Oryzanol protects against acute cadmium-induced oxidative damage in mice testes**, *Food and chemical toxicology*. 55 (2013) 526-532.
- [5] S. X. Sing, H. H. Lee, S. C. Wong, C. F. J. Bong, P. H. Yiu, **Ferulic acid, Gamma Oryzanol and GABA content in whole grain rice and their variation with bran colour**, *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 27 (2015) 706.
- [6] M. T. Maziero, L. D. S. Bersot, **Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil**, *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 12 (2010) 89-99.
- [7] H. P. Egmond, R. C. Schothorst, M. A. Jonker, **Regulations relating to mycotoxins in food**, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389 (2007) 147-157.
- [8] L. B. Bullerman, A. Bianchini, **Stability of mycotoxins during food processing**, *International Journal of Food Microbiology*. 119 (2007) 140-146.
- [9] F. D. C. O. Freire, I. G. P. Vieira, M. I. F. Guedes, F. N. P. Mendes, **Micotoxinas: importância na alimentação e na saúde humana e animal**, Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. (2007).
- [10] B. T. Iamanaka, I. S. Oliveira, M. H. Taniwaki, **Micotoxinas em alimentos**, *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*. 7 (2013) 138-161.

- [11] S. Marin, A. J. Ramos, G. Cano-Sancho, V. Sanchis, **Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment**, Food and Chemical Toxicology. 60 (2013) 218-237.
- [12] A. Mally, M. Solfrizzo, G. Degen, **Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: current state-of-the art and application to human exposure assessment**, Archives of toxicology. 90 (2016) 1281-1292.
- [13] Y. Jee, E. M. Noh, E. S. Cho, H. Y. Son, **Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by Zearalenone in rat**, Journal of veterinary Science. 11 (2010) 115-119.
- [14] H. Abassi, I. Ayed-Boussema, S. Shirley, S. Abid, H. Bacha, O. Micheau, **The mycotoxin Zearalenone enhances cell proliferation, colony formation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116**, Toxicology letters. 254 (2015) 1-7.
- [15] V. Kumar, M. S. Basu, T. P. Rajendran, **Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities**, Crop Protection, 27 (2008) 891-905.
- [16] S. P. Boeira, C. Borges Filho, L. Del'Fabbro, S. S. Roman, L. F. F. Royes, M. R. Figuera, A. F. Furian, **Lycopene treatment prevents hematological, reproductive and histopathological damage induced by acute Zearalenone administration in male Swiss mice**, Experimental and Toxicologic Pathology. 66 (2014) 179-185.
- [17] A. Zinedine, J. M. Soriano, J. C. Molto, J. Manes, **Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of Zearalenone: an oestrogenic mycotoxin**, Food and chemical toxicology. 45 (2007) 1-18.
- [18] H. P. Misra, I. Fridovich, **The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase**, J. Biol. Chem. 247 (1972) 3170-3175.
- [19] A. Wendel, **Glutathione peroxidase**, Methods Enzymol. 177 (1981) 325-333.
- [20] W. H. Habig, M. J. Pabst, W. B. Jakoby, **Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation**, Journal of biological Chemistry. 249 (1974) 7130-7139.
- [21] H. Aebi, **Catalase in vitro**, Methods in enzymology. 105 (1984) 121-126.

- [22] I. Carlberg, B. Mannervik, **Glutathione reductase**, *Methods in enzymology*. 113 (1985) 484-490.
- [23] P. J. Hissin, R. Hilf, **A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues**, *Anal Biochem*. 74 (1976) 214-226.
- [24] M. Freund, B. Carol, **Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human semen**, *J. Reprod. Fertil*. 8 (1964) 149-155.
- [25] M. M. Bradford, **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**, *Analytical biochemistry*. 72 (1976) 248-254.
- [26] S. P. Boeira, V. R. Funck, C. Borges Filho, L. Del’Fabbro, M. G. de Gomes, F. Donato, A. F. Furian, **Lycopene protects against acute Zearalenone-induced oxidative, endocrine, inflammatory and reproductive damages in male mice**, *Chemico-biological interactions*. 230 (2015) 50-57.
- [27] K. Jana, X. Yin, R.B. Schiffer, J. J. Chen, A.K. Pandey, D. M. Stocco, P. Grammas, X. Wang, **Chrysin, a natural flavonoid enhances steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression in mouse Leydig cells**, *J. Endocrinol*. 197 (2008) 315–332.
- [28] O. Ciftci, S. Tanyildizi, A. Godekmerdan, **Protective effect of curcumin on immune system and body weight gain in rats intoxicated with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)**, *Immunopharmacol. Immunotoxicol*. 32 (2010) 99–104.
- [29] K. V. Anand, M. S. M Jaabir, P. A. Thomas, P. Geraldine, **Protective role of chrysin against oxidative stress in D-galactose-induced aging in an experimental rat model**, *Geriatr. Gerontol. Int*. 12 (2012) 741–750.
- [30] M. Venkataramana, S. Chandra Nayaka, T. Anand, R. Rajesh, M. Aiyaz, S. T. Divakara, H. S Murali, H. S. Prakash, P. V. Lakshmana Rao, **Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: The role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine**, *Food Chem. Toxicol*. 65 (2014) 35-42.
- [31] G. Máté, Z. Gazdag, N. Mike, G. Papp, L. Pócsi, M. Pesti, **Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe***, *Toxicon*. 90 (2014) 155-166.

- [32] N. Mike, G. Papp, M. Čertik, Z. Czibulya, S. Kunsági-Máté, I. Ember, Z. Gazdag, **Regulation of cytotoxic, non-estrogenic, oxidative stress-induced processes of Z in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe***, *Toxicon*. 73 (2013) 130-143.
- [33] S. P. Boeira, C. Borges Filho, L. Del’Fabbro, L. F. F. Royes, C. R. Jesse, M. S. Oliveira, A. F. Furian, **Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute Zearalenone administration in Swiss albino mice**, *Toxicon*. 60 (2012) 358-366.
- [34] N. B. Tuncel, N. Yılmaz, **Gamma Oryzanol content, phenolic acid profiles and antioxidant activity of rice milling fractions**, *Eur. Food Res. Technol.* 233 (2011) 577–585.
- [35] M. E. Cuvelier, H. Richard, C. Berset, **Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: Structure-activity relationship**, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56 (1992) 324–325.
- [36] I. O. Minatel, F. V. Francisqueti, C. R. Corrêa & G. P. P. Lima, **Antioxidant Activity of γ -Oryzanol: A Complex Network of Interactions**. *Int. J. of Mol. Sci.* 17(8), 1107.
- [37] K. A. Szcześniak, P. Ostaszewski, A. Ciecierska, T. Sadkowski, **Investigation of nutraceutical phytochemical Gamma Oryzanol in experimental animal models**, *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 100 (2015) 601-617.
- [38] R. Milanino, V. Buchner, **Copper: role of the endogenous and exogenous metal on the development and control of inflammatory processes**, *Rev. Environ Health*. 21 (2006) 153-215.
- [39] A. Hebatallah, H. Darwish, R. M. Araba, **Chrysin alleviates testicular dysfunction in adjuvant arthritic rats via suppression of inflammation and apoptosis: Comparison with celecoxib**. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279 (2014) 129–140.
- [40] M. B. Frungieri, R. S. Calandra, L. Lustig, V. Meineke, F. M. Köhn, H. J. Vogt, A. Mayerhofer, **Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men**. *Fertil, Steril.* 78 (2002) 298-306.
- [41] S. -Y. Zhang, J. Ueyama, Y. Ito, Y. Yanagiba, A. Okamura, M. Kamijima, T. Nakajima, **Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to the cis isomer not trans isomer**, *Toxicology*. 248 (2008) 136–141.

- [42] Z. Xu, Na. Hua, J. S. Godber, **Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2, 2'-azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (2001) 2077-2081.
- [43] M. S. Islam, T. Murata, M. Fujisawa, R. Nagasaka, H. Ushio, A. M. Bari, M. Hori, H. Ozaki, **Anti-inflammatory effects of phytosteryl ferulates in colitis induced by dextran sulphate sodium in mice**, *Br. J. Pharmacol.* 154 (2008) 812–824.
- [44] C. Saenjum, C. Chaiyasut, S. Chansakaow, M. Suttajit, B. Sirithunyalug, **Antioxidant and anti-inflammatory activities of Gamma Oryzanol rich extracts from Thai purple rice bran**, *Journal of Medicinal Plants Research*. 6 (2012) 1070-1077.
- [45] P. Jacobo, V. A. Guazzone, M. S. Theas, L. Lustig, **Testicular autoimmunity**, *Autoimmunity reviews*. 10 (2011) 201-204.
- [46] B. K. Choi, J. H. Cho, S. H. Jeong, H. S. Shin, S. W. Son, Y. K. Yeo, H. G. Kang, **Zearalenone affects immune-related parameters in lymphoid organs and serum of rats vaccinated with porcine parvovirus vaccine**, *Toxicological research*. 28 (2012) 279-288.
- [47] J. Y. Yang, G. X. Wang, J. L. Liu, J. J. Fan, S. Cui, **Toxic effects of Zearalenone and its derivatives α -zearalenol on male reproductive system in mice**, *Reproductive Toxicology*. 24 (2007) 381-387.
- [48] M. Liu, R. Gao, Q. Meng, Y. Zhang, C. Bi, A. Shan, **Toxic effects of maternal Zearalenone exposure on intestinal oxidative stress, barrier function, immunological and morphological changes in rats**, *PloS one*. 9 (2014) e106412.
- [49] C. Zhou, Y. Zhang, S. Yin, Z. Jia, A. Shan, **Biochemical changes and oxidative stress induced by Zearalenone in the liver of pregnant rats**, *Human & experimental toxicology*. 34 (2015) 65-73.
- [50] H. Chen, L. Zhou, C. Y. Lin, M. C. Beattie, J. Liu, B. R. Zirkin, **Effect of glutathione redox state on Leydig cell susceptibility to acute oxidative stress**, *Molecular and cellular endocrinology*. 323(2010) 147-154.
- [51] J. J. Lysiak, **The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis**, *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2(2004) 9.

- [52] C. Rival, M. S. Theas, V. A. Guazzone, L. Lustig, **Interleukin-6 and IL-6 receptor cell expression in testis of rats with autoimmune orchitis**, *Journal of reproductive immunology*. 70 (2006) 43-58.

Legends:

Figure 1. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on (A) number of spermatozoa in epididymis (F (2,30) = 1.70; p<0.20), (B) percentage of motile spermatozoa (F (2,30) = 8.12; p<0.001), (C) plasmatic levels of testosterone (F (2,18) = 12.03; p<0.0001) and (D) testis weight (F (2,24) = 4.79; p<0.01). Data are mean \pm S.E.M. for n = 6 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

Figure 2. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on serum levels of IL-1 β (2A) (F (2,18) = 47.03; p<0.0001), IL- 6 (2B) (F (2,18) = 25.14; p<0.0001), IL-10 (2C) (F (2,18) = 7.40; p< 0.004) and TNF- α (2D) (F (2,18) = 100.96; p<0.0001). Data are mean \pm S.E.M. for n = 7 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

Figure 3. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on levels of 4-HNE (3A) (F (2,24) = 27.65; p<0.0001), 8-OHdG (3B) (F (2,24) = 48.31; p<0.0001) and protein carbonyl (3C) (F (2,24) = 19.60; p<0.0001). Data are mean \pm S.E.M. for n = 6 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

Figures:

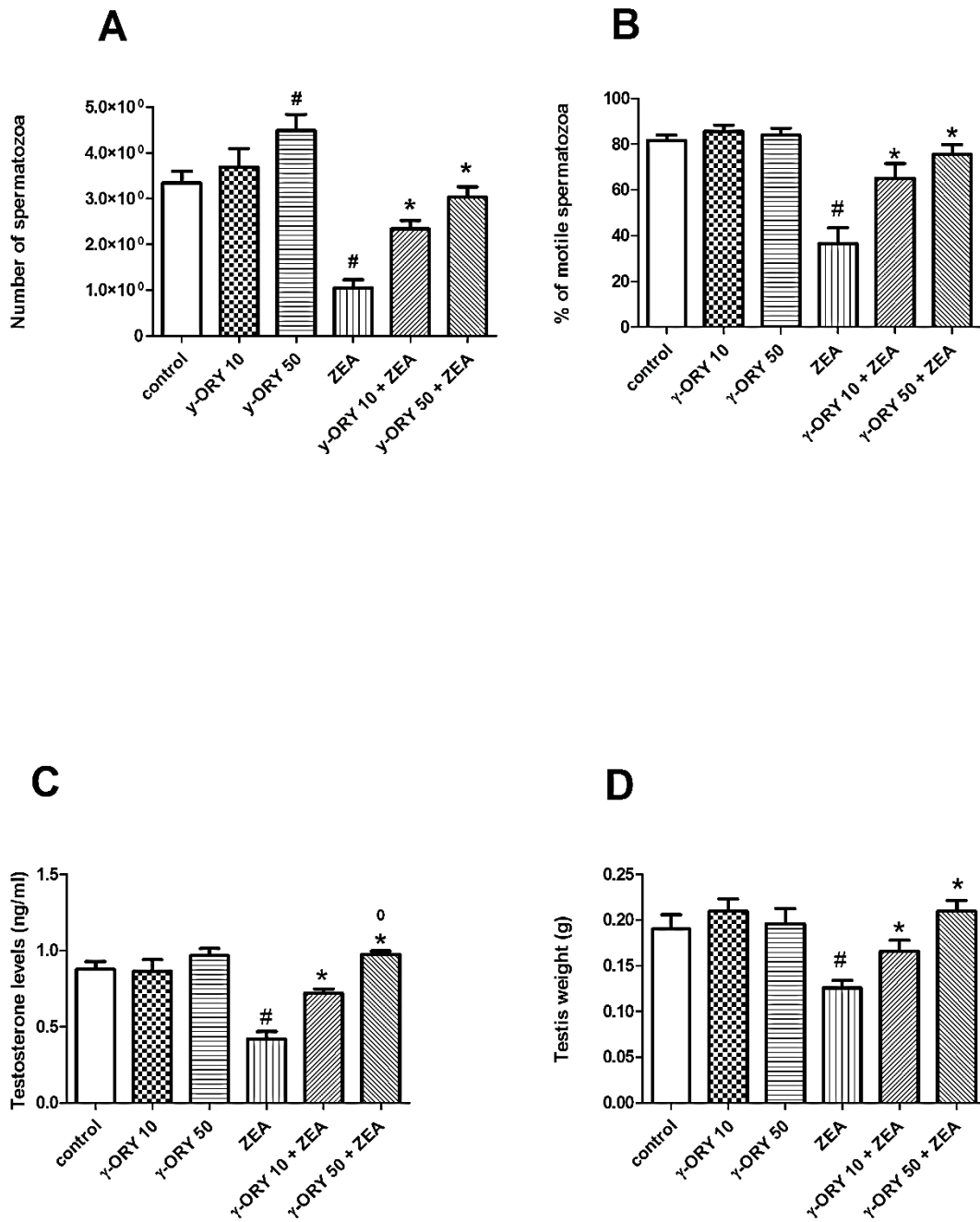


Figure 1: Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on (A) number of spermatozoa in epididymis ($F(2,30) = 1.70$; $p < 0.20$), (B) percentage of motile spermatozoa ($F(2,30) = 8.12$; $p < 0.001$), (C) plasmatic levels of testosterone ($F(2,18) = 12.03$; $p < 0.0001$) and (D) testis weight ($F(2,24) = 4.79$; $p < 0.01$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 6$ animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

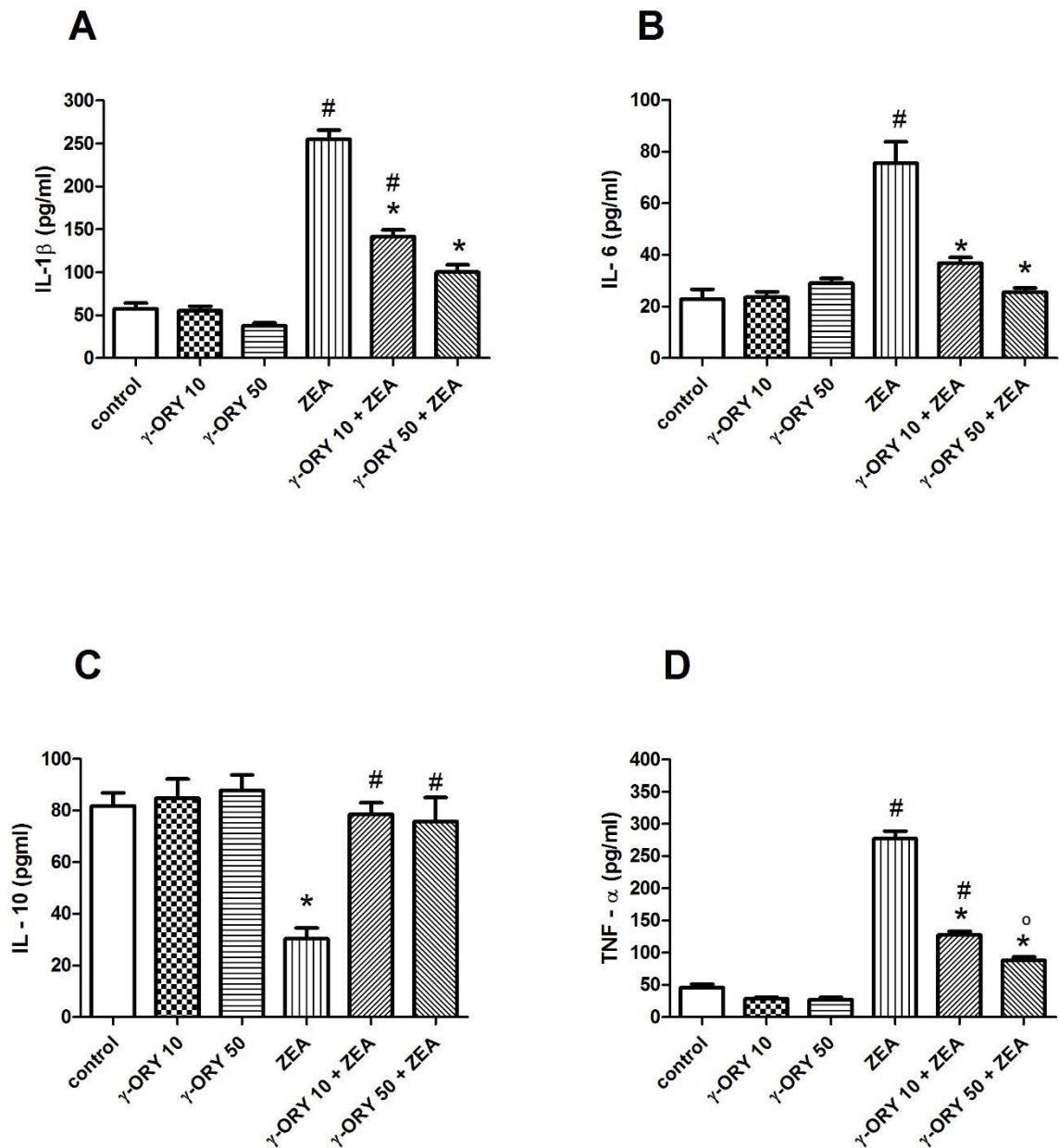


Figure 2. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on serum levels of IL-1 β (2A) ($F(2,18) = 47.03$; $p < 0.0001$), IL-6 (2B) ($F(2,18) = 25.14$; $p < 0.0001$), IL-10 (2C) ($F(2,18) = 7.40$; $p < 0.004$) and TNF- α (2D) ($F(2,18) = 100.96$; $p < 0.0001$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 7$ animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

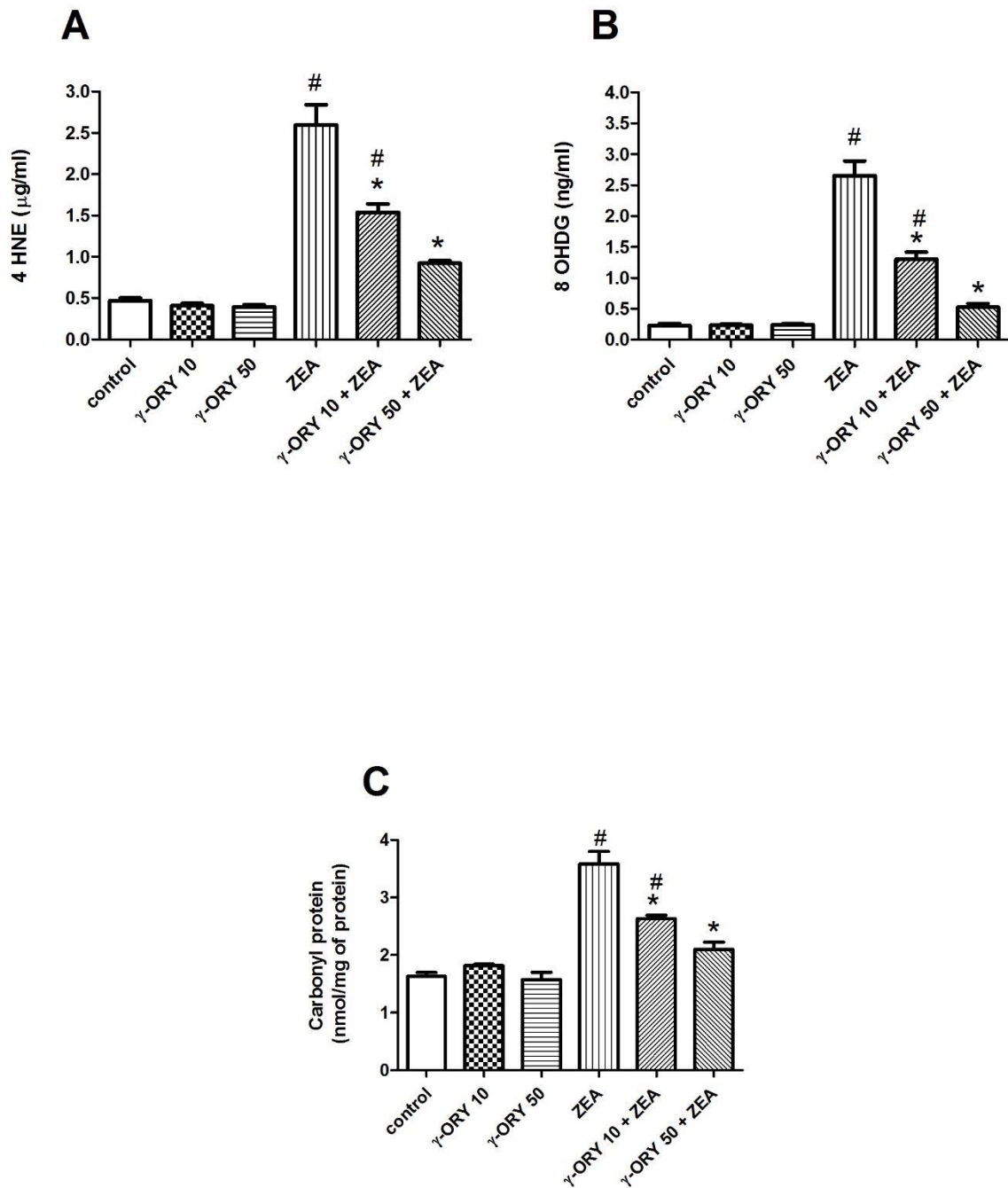


Figure 3. Effect of γ -ORY (10 and 50 mg/kg, p.o.) and ZEA (40 mg/kg, p.o.) on levels of 4-HNE (3A) ($F(2,24) = 27.65$; $p < 0.0001$), 8-OHdG (3B) ($F(2,24) = 48.31$; $p < 0.0001$) and protein carbonyl (3C) ($F(2,24) = 19.60$; $p < 0.0001$). Data are mean \pm S.E.M. for $n = 6$ animals in each; group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ° Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

Tables:**Table 1.** Effect of γ -ORY (10 and 50 mg / kg, po) on the activity of antioxidant enzymes (GPx, GR, GST, CAT and SOD) in testes of male mice exposed to ZEA (40 mg / kg, po).

GRUPOS	GPx	GR	GST	CAT	SOD
Controle	78,40 \pm 3,69	67.00 \pm 3,91	72,40 \pm 4,41	88,20 \pm 4,81	74,00 \pm 6,45
γ -ORY 10 + vehicle	92,20 \pm 5,26	64.80 \pm 3,35	65,60 \pm 4,55	95,00 \pm 6,58	69,60 \pm 5,06
γ -ORY 50 + vehicle	89,80 \pm 5,92	64.80 \pm 4,15	76,80 \pm 6,32	94,20 \pm 5,45	81,00 \pm 4,61
Vehicle + ZEA	50,20 \pm 4,39 [#]	25.40 \pm 2,83 [#]	32,20 \pm 6,43 [#]	100,60 \pm 11,25	69,40 \pm 9,23
γ -ORY 10 + ZEA	85,00 \pm 2,73*	53.60 \pm 6,96*	52,00 \pm 2,68*	98,00 \pm 6,44	75,40 \pm 11,41
γ -ORY 50 + ZEA	103,80 \pm 13,08*	61.60 \pm 3,41*	70,20 \pm 4,84* ^o	98,00 \pm 11,26	85,20 \pm 10,76

GPx: F (2.24) = 4.87; (P <0.01) (nmol of NADPH min⁻¹ mg⁻¹ protein); GR: F (2.24) = 10.99; (P <0.05) (NADPH nmol per min⁻¹ / mg⁻¹); GST: F (2.24) = 6.18; (P <0.001). (Nmol CDNB / min / mg protein); CAT: main effect of ZEA: F (1,24) = 0,94; (P <0.34) and γ -ORY: F (2.24) = 0.04; (P <0.96) (H₂O₂ nmol consumed per minute per milligram of protein) and SOD: main effect of ZEA: F (1.24) = 0.07; (P <0.79) and γ -ORY: F (2.24) = 1.16; (P <0.33) (units per milligram of protein). Data are the mean \pm standard deviation. N = 6 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ^o Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY. CAT and SOD had no significant statistically results.

Table 2. Effect of γ -ORY on levels of non-enzymatic antioxidants (GSH, GSSG and ratio GSH/GSSG) in testis of male mice exposed to ZEA (40 mg/kg, p.o.).

GROUPS	GSH	GSSG	GSH/GSSG
Control	1,304 \pm 0,04	0,2840 \pm 0,01	4,684 \pm 0,40
γ -ORY 10 + vehicle	1,590 \pm 0,03	0,2340 \pm 0,01	6,882 \pm 0,36
γ -ORY 50 + vehicle	1,564 \pm 0,11	0,2520 \pm 0,02	6,521 \pm 0,84
Vehicle + ZEA	0,6380 \pm 0,04#	0,4540 \pm 0,02#	1,424 \pm 0,14#
γ -ORY 10 + ZEA	0,9020 \pm 0,06*#	0,2620 \pm 0,01*	3,582 \pm 0,37*
γ -ORY 50 + ZEA	1,375 \pm 0,07* ^o	0,2840 \pm 0,01*	4,879 \pm 0,27*

GSH: F (2.24) = 7.94; (P <0.002) (μ g / mg protein); GSSG: F (2.24) = 8.59; (P <0.001) (μ g / mg protein); GSH / GSSG: F (2.24) = 2.14; (P <0.13). Data are mean \pm S.E.M. For n = 6 animals in each group. * Indicates a significant difference compared with ZEA group. ^o Indicates a significant difference compared with ZEA group and γ -ORY 10 + ZEA. # Indicates a significant difference compared with control group and γ -ORY.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

A administração oral aguda de ZEA causou uma diminuição no peso dos testículos, no número e na motilidade dos espermatozoides e também diminuiu os níveis de testosterona, porém estes parâmetros foram atenuados pelo pré tratamento com o γ -ORY;

A administração oral aguda de ZEA aumentou os níveis das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) e diminuiu os níveis da citocina anti-inflamatória IL-10;

A administração oral aguda de ZEA elevou os níveis de 4-HNE, 8-OHdG e o teor de proteína carbonilada;

A administração oral aguda de ZEA causou uma inibição na atividade das enzimas antioxidantes GST, GR e GPx, sendo atenuado pelo pré tratamento com γ -ORY, mas não apresentou qualquer alteração nas enzimas SOD e CAT;

A administração oral aguda de ZEA reduziu o nível do marcador de estresse oxidativo GSH e a relação GSH/GSSG e também aumentou os níveis de GSSG.

Com base nestes resultados, sugere-se que a administração oral aguda de ZEA atuou através da depleção das defesas antioxidantes dando início ao processo inflamatório e que o pré-tratamento com o γ -ORY atenuou a depleção das defesas antioxidantes e também melhorou os parâmetros reprodutivos e inflamatórios.

7. PERSPECTIVAS

A fim de obter um melhor entendimento a respeito dos mecanismos de toxicidade e dos efeitos tóxicos provocados pela micotoxina ZEA e o efeito do γ -ORY este trabalho terá continuidade no doutorado.

Avaliar o efeito do γ -ORY em um modelo de exposição crônica a ZEA;

Determinar os indicadores não-enzimáticos de estresse oxidativo como as espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), conteúdo de grupos tióis não-protéicos (NPSH) em fígado, rins e testículos, após a administração crônica de ZEA e tratados com γ -ORY;

Avaliar os parâmetros hematológicos (leucócitos totais, segmentados, bastões, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas) através de esfregaço sanguíneo, após a administração crônica de ZEA e tratados com γ -ORY;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABASSI, H. et al. The mycotoxin ZEA enhances cell proliferation, colony formation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116. **Toxicology letters**, v. 254, p. 1-7, 2016.

ACCINNI, R. et al. Effects of combined dietary supplementation on oxidative and inflammatory status in dyslipidemic subjects. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 16, n. 2, p. 121-127, 2006.

AKIHISA, T. et al. Triterpene alcohol and sterol ferulates from rice bran and their anti-inflammatory effects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2313-2319, 2000.

BENJAMIN, D.; KNOBLOCH, T. J.; DAYTON, M. A. Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10 [see comments]. **Blood**, v. 80, n. 5, p. 1289-1298, 1992.

BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Basmati rice: a review. **International journal of food science & technology**, v. 37, n. 1, p. 1-12, 2002.

BOL, E. K. et al. Estimated exposure to ZEA, ochratoxin A and aflatoxin B1 through the consume of bakery products and pasta considering effects of food processing. **Food and Chemical Toxicology**, v. 89, p. 85-91, 2016.

BUCCI, R. et al. Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of γ -oryzanol in rice bran oil. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 375, n. 8, p. 1254-1259, 2003.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 140-146, 2007.

CAZENAVE, S.; MÍDIO, A. A simplified method for the determination of zearalenone in corn-flour. **Alimentaria**, n. 298, p. 27-29, 1998a.

CAZENAVE, S.; MÍDIO, A. Zearalenona-micotoxina com atividade estrogenica presente em alimentos. Caderno de nutrição zearalenone in corn-flour. **Alimentaria**, v. 16, p. 1-13, 1998b.

CHEN, C.W.; CHENG, H. H. A rice bran oil diet increases LDL-receptor and HMG-CoA reductase mRNA expressions and insulin sensitivity in rats with streptozotocin/nicotinamide-induced type 2 diabetes. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 6, p. 1472-1476, 2006.

CHRISTENSEN, C. M.; NELSON, G. H.; MIROCHA, C. J. Effect on the white rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. **Applied microbiology**, v. 13, n. 5, p. 653-659, 1965.

CONCON, J. M. et al. **Food toxicology. Part A: Principles and concepts; Part B: Contaminants and additives**. Marcel Dekker Inc., 1988.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 56, n. 2, p. 324-325, 1992.

DEEPAM, L. S. A.; SUNDARESAN, A.; ARUMUGHAN, C. Stability of rice bran oil in terms of oryzanol, tocopherols, tocotrienols and sterols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 7, p. 1001-1009, 2011.

DIACK, M.; SASKA, M. Separation of vitamin E and γ -oryzanols from rice bran by normal-phase chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 11, p. 1211, 1994.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and its biologically related cytokines. **Advances in immunology**, v. 44, p. 153-205, 1989.

D'MELLO, J. P. F.; DUFFUS, C. M.; DUFFUS, J. H. **Toxic substances in crop plants**. Woodhead Publishing, 1991.

DUCA, R. C. et al. *In vivo* effects of Zearalenone on the expression of proteins involved in the detoxification of rat xenobiotics. **Environmental toxicology**, v. 27, n. 2, p. 98-108, 2012.

EFSA, EFSA. Panel on contaminants in the food chain: Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of alternaria toxins in feed and food. **EFSA Journal**, v. 9, p. 2407, 2011.

EGMOND, H. P.; SCHOTHORST, R. C.; JONKER, M. A. Regulations relating to mycotoxins in food. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 1, n. 389, p. 147-157, 2007.

FAO. Worldwide regulations for micotoxins in food and in feed in 2003. (**FAO. Food and Nutrition Paper**, 81). Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/007/y5499e/y5499e07.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

FITZPATRICK, D. W. et al. Measurement of the relative binding affinity of Zearalenone, α -zearalenol and β -zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 94, n. 2, p. 691-694, 1989.

FORGACS, J. et al. Mycotoxicoses. **Adv. Vet. Sci.**, v. 7, p. 273-882., 1962.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Filamentous in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production. **Handbook of applied mycology: Mycotoxins in ecological systems**, v. 5, p. 32-57, 1992.

GROMADZKA, K. et al. Occurrence of estrogenic mycotoxin Zearalenone in aqueous environmental samples with various NOM content. **Water research**, v. 43, n. 4, p. 1051-1059, 2009.

HAGLER, W. M. et al. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. **Applied and environmental microbiology**, v. 37, n. 5, p. 849-853, 1979.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 280, n. 1, p. 1-8, 1990.

HASSEN, W. et al. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: Oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. **Toxicology**, v. 232, n. 3, p. 294-302, 2007.

HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical journal**, v. 265, n. 3, p. 621, 1990.

HUANG, S. H.; LEAN-TEIK. N. G. Quantification of tocopherols, tocotrienols, and Gamma Oryzanol contents and their distribution in some commercial rice varieties in Taiwan. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11150-11159, 2011.

IMSANGUAN, P. et al. Extraction of α -tocopherol and γ -oryzanol from rice bran. **LWT-Food Science and technology**, v. 41, n. 8, p. 1417-1424, 2008.

ISMAIL, M. et al. Gamma Oryzanol rich fraction regulates the expression of antioxidant and oxidative stress related genes in stressed rat's liver. **Nutrition & metabolism**, v. 7, n. 1, p. 1-23, 2010.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

JENG, T. L. et al. γ - Oryzanol, tocol and mineral compositions in different grain fractions of giant embryo rice mutants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 7, p. 1468-1474, 2012.

JULIANO, C. et al. Antioxidant activity of gamma-oryzanol: mechanism of action and its effect on oxidative stability of pharmaceutical oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 299, n. 1, p. 146-154, 2005.

KANEKO, R.; TSUCHIYA, T. New compound in rice bran and germ oils. **J Chem Soc Jpn**, v. 57, p. 526-529, 1954.

LE BARS, J.; LE BARS, P. Strategy for safe use of fungi and fungal derivatives in food processing. **Revue de Medecine Veterinaire (France)**, 1998.

LERMA-GARCIA, M. J. et al. Composition, industrial processing and applications of rice bran γ -oryzanol. **Food Chemistry**, v. 115, n. 2, p. 389-404, 2009.

LLOYD, B. J.; SIEBENMORGEN, T. J.; BEERS, K. W. Effects of Commercial Processing on Antioxidants in Rice Bran 1. **Cereal Chemistry**, v. 77, n. 5, p. 551-555, 2000.

LOFTUS, J. H. et al. Patulin, Deoxynivalenol, Zearalenone and T-2 Toxin Affect Viability and Modulate Cytokine Secretion in J774A. 1 Murine Macrophages. **International Journal of Chemistry**, v. 8, n. 2, p. 22, 2016.

LU, T. J.; CHEN, H. N.; WANG, H. J. Chemical constituents, dietary fiber, and γ -oryzanol in six commercial varieties of brown rice from Taiwan. **Cereal chemistry**, v. 88, n. 5, p. 463-466, 2011.

MALEKINEJAD, H. et al. Expression of 3 α - and 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in COCs and granulosa cells determines Zearalenone biotransformation. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 4, p. 458-463, 2006.

MALLY, A.; SOLFRIZZO, M.; DEGEN, G. H. Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: current state-of-the art and application to human exposure assessment. **Archives of toxicology**, v. 90, n. 6, p. 1281-1292, 2016.

MANDAK, E.; NYSTRÖM, L. The effect of *in vitro* digestion on steryl ferulates from rice (*Oryza sativa* L.) and other grains. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 24, p. 6123-6130, 2012.

MARIN, S. et al. Mycotoxins: occurrence, toxicology, and exposure assessment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 218-237, 2013.

MARROQUÍN-CARDONA, A. G. et al. Mycotoxins in a changing global environment—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 69, p. 220-230, 2014.

MÍDIO, A. F., MARTINS D. I., **Toxicologia de alimentos**. Varela Editora Livraria CDTA São Paulo, p. 79-85, 2000.

MINATEL, I. O. et al. Antioxidant Activity of γ -Oryzanol: A Complex Network of Interactions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1107, 2016.

MINERVINI, F. et al. Investigations on cellular proliferation induced by Zearalenone and its derivatives in relation to the estrogenic parameters. **Toxicology letters**, v. 159, n. 3, p. 272-283, 2005.

MOLINA-MOLINA, J. M. et al. Assessment of estrogenic and anti-androgenic activities of the mycotoxin Zearalenone and its metabolites using *in vitro* receptor-specific bioassays. **Food and Chemical Toxicology**, v. 74, p. 233-239, 2014.

OGA, Seize. **Fundamentos de Toxicologia**. Ed. Atheneu: São Paulo, p. 616, 2008.

PASCUAL, C. S. C. I. et al. Effects of parboiling, storage and cooking on the levels of tocopherols, tocotrienols and Gamma Oryzanol in brown rice (*Oryza sativa* L.). **Food research international**, v. 50, n. 2, p. 676-681, 2013.

PATEL, M.; NAIK, S. N. Gamma-oryzanol from rice bran oil—A review. 2004.
RICHARDSON, K. E.; HAGLER J. R. W. M.; MIROCHA, C. J. Production of Zearalenone, alpha - and beta -zearalenol, and alpha - and. beta - zearalanol by *Fusarium* spp. in rice culture. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 33, n. 5, p. 862-866, 1985.

RYU, D.; HANNA, M. A.; BULLERMAN, L. B. Stability of Zearalenone during extrusion of corn grits. **Journal of Food Protection®**, v. 62, n. 12, p. 1482-1484, 1999.

SCHULLER, P. L.; VAN EGMOND, H. P.; STOLOFF, L. Limits and regulations on mycotoxins. 1983.

SENA, L. A.; CHANDEL, N. S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. **Molecular cell**, v. 48, n. 2, p. 158-167, 2012.

SOMPONG, R. et al. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 132-140, 2011.

SOSBAI, Sociedade Sul Brasileira de Arroz Irrigado. **Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Porto Alegre: Gráfica e Editora Palloti. p. 191, 2016.

STARK, A. A. Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins: DNA binding as a possible mode of action. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 235-262, 1980.

STOEV, S. D. Foodborne mycotoxicoses, risk assessment and underestimated hazard of masked mycotoxins and joint mycotoxin effects or interaction. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 794-809, 2015.

STORR, S. J. et al. Redox environment, free radical, and oxidative DNA damage. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 18, p. 2399-2408, 2013.

SZCZEŚNIAK, K. A. et al. Investigation of nutritive phytochemical gamma-oryzanol in experimental animal models. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 2015.

TUNCEL, N. B.; YILMAZ, N. Gamma Oryzanol content, phenolic acid profiles and antioxidant activity of rice milling fractions. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 4, p. 577-585, 2011.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): a critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. **Journal of environmental science and health Part C**, v. 27, n. 2, p. 120-139, 2009.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VARELLA, P. P.V.; FORTE, W. C. N. Citocinas: revisão. **Rev bras alergologia imunopatol**, v. 24, p. 146-154, 2001.

WOOD, G. E. Mycotoxins in foods and feeds in the United States. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p. 3941-3949, 1992.

XU, Z.; GODBER, J. S. Purification and identification of components of Gamma Oryzanol in rice bran oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 2724-2728, 1999.

XU, Z.; HUA, N.; GODBER, J. S. Antioxidant activity of tocopherols, tocotrienols, and γ -oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2, 2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 2077-2081, 2001.

YU, S. et al. Quantification of vitamin E and Gamma Oryzanol components in rice germ and bran. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7308-7313, 2007.

ZATECKA, E. et al. Effect of Zearalenone on reproductive parameters and expression of selected testicular gene in mice. **Reproductive Toxicology**, v. 45, p. 20-30, 2014.

ZINEDINE, A. et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of Zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. **Food and chemical toxicology**, v. 45, n. 1, p. 1-18, 2007.

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1 – Protocolo de aprovação de projeto CEUA – UNIPAMPA



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

Pró-Reitoria de Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DE PROTOCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Número de protocolo da CEUA: **021/2014**

Título: **O efeito protetor do gama orizanol sobre lesão hepática induzida em camundongos**

Data da aprovação: **02/06/2014**

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

Pesquisador: **CRISTIANO RICARDO JESSE**

Campus: **ITAQUI**

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

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Alessandra S. K. Tamajusuku Neis'.

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