

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

**CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS TÓXICOS DECORRENTES DA
EXPOSIÇÃO AGUDA À MICOTOXINA ZEARALENONA EM
CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Silvana Peterini Boeira

**Itaqui, RS, Brasil.
2012**

**CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS TÓXICOS DECORRENTES DA
EXPOSIÇÃO AGUDA À MICOTOXINA ZEARALENONA EM
CAMUNDONGOS**

por

Silvana Peterini Boeira

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Bioquímica, pelo programa de
pós-graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Furian
Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

Itaqui, RS, Brasil.

2012

Universidade Federal do Pampa
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

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

**CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS TÓXICOS DECORRENTES DA
EXPOSIÇÃO AGUDA À MICOTOXINA ZEARALENONA EM
CAMUNDONGOS**

elaborada por

Silvana Peterini Boeira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Furian
(Presidente, orientadora)

Prof^a. Dr^a. Marina Venturini Copetti
(UFSM)

Prof^a. Dr^a. Francielli Weber Santos Cibin
(UNIPAMPA)

Itaqui, RS, Brasil.

2012

DEDICO

**Aos meus pais, Loreni e Paulo,
que me ensinaram mais
do que eu jamais pude aprender,
pelo estímulo e apoio incondicional
durante todos esses anos.**

**Ao Cristiano, por me apoiar
com seu amor, amizade,
atenção e paciência.**

**À minha orientadora,
Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Furian,
pela amizade, pelo constante
incentivo, pelos ensinamentos
transmitidos e, especialmente,
pela paciência e confiança
no meu trabalho.**

AGRADECIMENTOS

Ao final desta caminhada, gostaria de manifestar minha gratidão a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Em especial, agradeço:

À Prof.^a Dr.^a Ana Flávia Furian por sua orientação, confiança e estímulo durante a realização do trabalho.

Ao Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse pela co-orientação no transcorrer deste trabalho e apoio durante o processo de finalização.

Ao Prof. Dr. Mauro Oliveira pelo suporte estatístico, auxiliando-me no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes pelo suporte científico na realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Carlos Borges Filho, Lucian Del Fabbro, Marcelo Gomes de Gomes, André Rossito Goes, Stífani Araújo e Micheli Zarzecki pela convivência agradável, pela paciência, pela constante ajuda e auxílio, pelas risadas e brincadeiras e principalmente pela vontade de ver este trabalho concretizado. Em especial, ao Carlos e o Lucian que trabalharam de modo efetivo desde o início deste projeto contribuindo para a sua rápida resolução.

Aos meus pais, Loreni e Paulo, minhas irmãs, Paula e Flávia e meus cunhados, Alfredo e Dany que me incentivaram e me tranquilizaram e apoiaram de todas as maneiras neste período.

As minhas colegas e amigas Sílvia, Aninha e Clarissa pelo apoio, amizade e momentos agradáveis.

Ao meu colega José Jorge Queiroz Machado Vieira pela compreensão e paciência neste período em que estive muitas vezes ausente no laboratório.

Aos colegas de pós-graduação que torceram por mim e contribuíram com sua amizade, especialmente ao Leandro Cattelan, que foi meu colega e companheiro de viagem.

Aos professores Carla Sehn, Leocir Welter, Leomar da Silva e Paula da Costa que conviveram comigo durante este período e tiveram paciência e compreensão no compartilhamento da mesma sala e das conversas.

Aos professores Marina Venturini Copetti e Francielli Weber Santos Cibin por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Aos professores e funcionários do programa de pós-graduação em Bioquímica pela oportunidade em realizar o mestrado, pela preocupação com a importância da finalização deste trabalho e, sobretudo, pela condução deste programa visando o fortalecimento de nossa formação.

À Universidade Federal do Pampa, pela oportunidade oferecida de realizar o curso de mestrado.

Ao programa de bolsas de desenvolvimento acadêmico, PBDA, pela concessão da bolsa de estudos.

A CAPES e a FAPERGS, que garantiram o sustento financeiro necessário à realização deste projeto de mestrado.

Com todos quero compartilhar esta vitória e dizer, **MUITO OBRIGADA!!!**

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	14
Lista de Tabelas.....	16
Perspectivas.....	100
Anexo I.....	101

PARTE I

Resumo.....	11
Abstract.....	12
Lista de Abreviaturas.....	13
Introdução.....	18
1.1 Micotoxinas.....	18
1.2 Gênero <i>Fusarium</i>	20
1.3 Zearalenona.....	22
1.3.1 Estrutura Química e Histórico.....	22
1.3.2 Ocorrência e condições de desenvolvimento.....	24
1.3.3 Toxicocinética.....	26
1.3.4 Toxicodinâmica.....	29
2. Estresse Oxidativo.....	32
Objetivos.....	35

PARTE II

CAPÍTULO I.

Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice.....	36
1. Introduction.....	41
2. Material and Methods.....	43

2.1. Animals and Reagents.....	43
2.2. Experimental design and sampling.....	44
2.3. Open Field test.....	44
2.4. Body weight and vital organs relative weight.....	45
2.5. Blood Cells.....	45
2.6. Number and motility of spermatozoa.....	45
2.7. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) determination.....	46
2.8. Non protein thiols (NPSH) determination	46
2.9. Ascorbic acid determination (AA).....	47
2.10. Enzyme Assays.....	47
2.10.1Catalase (CAT) activity.....	47
2.10.2 Superoxide dismutase (SOD) activity	47
2.10.3 Glutathione S-transferase (GST) activity.....	48
2.11. Protein determination.....	48
2.12. Statistical Analysis.....	48
3. Results.....	48
4. Discussion.....	50

PARTE III

Discussão.....	73
Conclusões.....	81
Referências.....	82

PARTE I

RESUMO

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

CARACTERIZAÇÃO DE EFEITOS TÓXICOS DECORRENTES DA EXPOSIÇÃO AGUDA À MICOTOXINA ZEARALENONA EM CAMUNDONGOS

Autora: Silvana Peterini Boeira

Orientadora: Ana Flávia Furian

Co-orientador: Cristiano Ricardo Jesse

Local e Data da defesa: Uruguiana, 27 de fevereiro de 2012.

A zearalenona (ZEA) é produzida por fungos da espécie *Fusarium*, e sua ocorrência é freqüente em grãos e cereais em todo o mundo. A ZEA é estruturalmente semelhante ao estrogênio, e, portanto, é responsável pela síndrome estrogênica, uma vez que possui capacidade de ativar os receptores de estrogênio provocando alterações funcionais dos órgãos do trato reprodutivo. Além disso, como uma micotoxina toxigênica e imunossupressora, altera parâmetros hematológicos e promove um desequilíbrio no sistema oxidativo, especialmente nas enzimas antioxidantes. Assim, o objetivo do nosso trabalho é avaliar os efeitos agudos causados pela administração oral de ZEA. Foram utilizados camundongos Swiss machos que receberam uma administração de ZEA (40 mg/kg), e após 48 horas foram submetidos a eutanásia. Como parâmetros de toxicidade, foram analisados os pesos dos órgãos (pulmão, fígado, baço, rins, testículos e epidídimos), análise comportamental, dosagem de parâmetros hematológicos pela contagem de leucócitos totais, frações (segmentados, bastões, eosinófilos, monócitos e linfócitos) e plaquetas, parâmetros reprodutivos pela contagem de espermatozoides e análise da motilidade e parâmetros do sistema oxidativo pela dosagem das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST), determinação de ácido ascórbico (AA), determinação de tióis não-proteicos (NPSH) e avaliação da peroxidação lipídica pela determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os resultados mostram que a intoxicação aguda por ZEA causa efeitos hematológicos pelo aumento da contagem total de leucócitos e das frações bem como diminuição da contagem de linfócitos e plaquetas. Os efeitos reprodutivos observados foram a redução significativa do número e motilidade de espermatozoides. Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo, a ZEA reduziu a atividade da GST nos testículos e nos rins, a atividade da SOD aumentou nos rins, fígado e testículos, e a atividade da CAT aumentou nos rins. A análise comportamental, a determinação de AA e NPSH assim como, o TBARS não sofreram alterações neste protocolo. Com base nos resultados confirma-se que o sistema reprodutivo é o principal alvo da ZEA, mesmo no protocolo de intoxicação aguda, e que existe uma relação entre o estresse oxidativo, especialmente a redução da atividade da GST, com as alterações espermáticas. Conclui-se que a administração aguda de ZEA induz efeitos tóxicos hematológicos reprodutivos, e provavelmente estes efeitos se relacionam com o estresse oxidativo.

Palavras-chave: micotoxina, intoxicação aguda, sistema reprodutivo, estresse oxidativo, camundongo.

ABSTRACT

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

CHARACTERIZATION OF TOXIC EFFECTS OF ACUTE EXPOSURE RESULTING THE MYCOTOXIN ZEARALENONE IN MICE

Author: Silvana Peterini Boeira

Advisor: Ana Flávia Furian

Co-advisor: Cristiano Ricardo Jesse

Site and Date of Defence: Uruguaiiana, February 27, 2012.

Zearalenone (ZEA) a non-steroidal estrogenic mycotoxin produced by several species of *Fusarium*, and its occurrence is common in grains and cereals worldwide. ZEA is structurally similar to estrogen, and therefore is responsible for the estrogen syndrome, since it has the ability to activate estrogen receptors, inducing functional changes in the reproductive tract organs. Moreover, as an immunosuppressive mycotoxin it has been demonstrated that elicits hematological and reproductive damage. Therefore, the current study was aimed to investigate the effects of an acute oral dose of ZEA. Adult Swiss albino male mice were exposed to a single oral injection of ZEA (40 mg/kg, p.o.), and 48 hours thereafter behavioral and biochemical tests were performed. In order to evaluate any possible toxic action of acute ZEA administration, the body and vital organs (lung, liver, spleen, kidney, testis and epididymis) relative weight were determined, as well as behavioral analysis, measurement of hematological and reproductive parameters (sperm count and motility). Additionally, markers of oxidative stress in liver, kidney and testes of mice were analysed by measuring the activity of antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione S-transferase (GST). Moreover, determination of ascorbic acid (AA), non-protein thiols (NPSH) and assessment of lipid peroxidation by determination of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were also analysed. Results show that ZEA caused acute hematological effects by increasing the total leukocyte number and fractions as well as a decreased lymphocyte and platelets number. ZEA drastically reduced the number and motility of live spermatozoa. Regarding the oxidative stress parameters, ZEA reduced the GST activity in the testis and kidney, SOD activity increased in kidney, liver and testis, and CAT activity increased in the kidneys. However, behavioral analysis, determination of AA and NPSH as well TBARS content were not altered by ZEA administration. In summary, we showed that ZEA have acute toxic effects mainly in reproductive system of adult male Swiss albino mice and its effect probably is related to a reduced activity of GST and increased in SOD activity in testes. We conclude that acute administration of ZEA induces hematological and reproductive toxicity, and probably these effects are related to oxidative stress.

Keywords: mycotoxin, acute intoxication, reproductive system, oxidative stress, mice.

LISTA DE ABREVIATURAS

ZEA - Zearalenona

ZAN - Zearalanona

α -ZAL - α -zearalanol

β -ZAL - β -zearalanol

α -ZOL - α -zearalenol

β -ZOL - β -zearalenol

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

MDA - Malondialdeído

TBA - Ácido tiobarbitúrico

NPSH - Tióis não-protéicos

AA - Ácido ascórbico

GHS - Forma reduzida da Glutathione

GST - Glutathione -S- transferase

SOD - Superóxido dismutase

CAT - Catalase

CDNB - 1-cloro- 2,4-dinitrobenzeno

DTNB - 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)

ERS - receptores estrogênicos

ER α - receptor estrogênico α

ER β - receptor estrogênico β

ROS - Espécies reativas de oxigênio

TCA - Ácido tricloroacético

GSTM3 - Glutathione -S- transferase isoforma M3

GSTM5 - Glutathione -S- transferase isoforma M5

GSTM1 - Glutathione -S- transferase isoforma M1

LD50 - Dose letal

LISTA DE FIGURAS

PARTE I

Figura 1 - Ilustração do Fungo <i>F. graminearum</i>	21
Figura 2 - Estrutura química da ZEA e seus metabólitos.....	23
Figura 3 - Estrutura química do hormônio estrogênio.....	23
Figura 4 - Metabólitos e enzimas da biotransformação da ZEA.....	28
Figura 5 - Metabolização e excreção da ZEA em suínos.....	29

PARTE II

Figura 1. Efeito da ZEA nos parâmetros hematológicos: Leucócitos (A), Segmentados (B), Bastões (C), Eosinófilos (D), Monócitos (E), Linfócitos (F) e Plaquetas (G) após 48 horas da administração de ZEA.....65

Figura 2. Efeito da ZEA nos parâmetros reprodutivos após 48 horas da administração de ZEA.....66

Figura 3. Efeito da ZEA na atividade da enzima CAT no fígado (A), rins (B) e testículos (C) após 48 horas da administração de ZEA.....67

Figura 4. Efeito da ZEA na atividade da enzima SOD no fígado (A), rins (B) e testículos (C) após 48 horas da administração de ZEA.....68

Figure 5. Efeito da ZEA na atividade da enzima GST no fígado (A), rins (B) e testículos (C) após 48 horas da administração de ZEA.....69

LISTA DE TABELAS

PARTE II

Tabela 1: Avaliação comportamental após 48 horas da administração de ZEA.....70

Tabela 2. Avaliação do peso relativo dos órgãos após 48 horas da administração de ZEA.....71

Tabela 3. Avaliação de AA, NPSH e TBARS em fígado, rins e testículos após 48 horas da administração de ZEA.....72

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item artigo científico. As seções materiais e métodos, resultados, discussão dos resultados e referências bibliográficas, encontram-se no próprio artigo e representam à íntegra deste estudo.

Os itens discussão e conclusões, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre os resultados apresentados no artigo científico contido neste trabalho.

As referências bibliográficas referem-se somente às citações que aparecem nos itens introdução, discussão e conclusões desta dissertação.

INTRODUÇÃO

1. Micotoxinas

As micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de fungos, sendo conceituadas como compostos não-essenciais ao desenvolvimento fúngico, formadas no estágio final da fase exponencial de crescimento (Santin et al., 2005). São produzidas por diversos gêneros de fungos, que contaminam produtos agrícolas em toda cadeia de produção alimentar desde o campo, colheita, transporte e armazenamento. As condições de pré e pós-colheita e os cultivos determinam o crescimento de gêneros específicos de fungos. Por estas razões é difícil a adoção de medidas universais para controle de todos estes microrganismos simultaneamente, e também das micotoxinas (Cast, 2003). O termo micotoxina é derivado da palavra grega “mykes” que significa fungo e “toxicum” que significa veneno ou toxina. Quando produzidos em associação com alimentos, ração animal e forragens, os metabólitos tóxicos podem ser ingeridos pelo homem e animais, provocando as micotoxicoses (Gonzalez et al., 2005).

Os mais importantes gêneros fúngicos produtores de micotoxinas são os *Aspergillus*, *Claviceps*, *Penicillium* e *Fusarium*. Os gêneros *Penicillium* e *Aspergillus* crescem preferencialmente durante o armazenamento dos grãos, e normalmente não causam problemas no campo. O gênero *Claviceps* cresce preferencialmente no campo. Já os fungos do gênero *Fusarium*, infectam os grãos na lavoura, são fitopatógenos, necessitam de umidade alta, 20 a 21%, e temperatura amena (Santin et al., 2005). Apesar de menos freqüente, é possível o desenvolvimento de micotoxinas de *Fusarium* na fase pós-colheita (Hollinger & Ekperigin, 1999; Santin et al., 2005).

A produção de micotoxinas ocorre quando os fungos são submetidos a condições de estresse. Nos grãos armazenados, a contaminação com fungos toxigênicos e a produção de micotoxinas são resultados da interação complexa entre umidade, temperatura, substrato, concentração de oxigênio e dióxido de

carbono, presença de insetos e fungos. Nas condições de campo o estresse ocorre por condições climáticas, intempéries, pragas, entre outros, que também resultam em perda de vigor pela planta predispondo-a a colonização por fungos toxigênicos (Santin et al., 2005).

Os impactos econômicos associados às micotoxinas incluem redução na produtividade com prejuízo no agronegócio de muitos países, interferindo ou até mesmo impedindo a exportação, reduzindo a produção animal e agrícola, afetando, também, a saúde humana (Leung et al., 2006). Além disso, o crescimento fúngico ocasiona baixo rendimento das culturas e perda nutricional dos grãos com redução do desempenho de animais alimentados com grãos, principalmente o milho (Pestka et al., 1995; Moreno et al., 2005; Santin et al., 2005). Fato que ocasiona danos aos órgãos vitais, aumento da incidência de doenças infecciosas em consequência da imunossupressão, interferência na capacidade reprodutiva, e em casos graves, morte de animais (Cast, 2003). As micotoxinas possuem capacidade genotóxica (IARC, 1999), sendo que seus efeitos negativos na saúde estão diretamente ligados à dose, ao tempo de exposição, espécie e idade do animal.

As micotoxinas são moléculas um tanto quanto diferentes, com estruturas que variam de simples anéis heterocíclicos apresentando peso molecular de até 50 Da, a grupos de 6 a 8 anéis heterocíclicos irregularmente dispostos e com peso molecular total >500 Da, que não apresentam imunogenicidade, ou seja, não são capazes de induzir ou reagir com os produtos de uma resposta imunológica (Betina, 1984).

As micotoxinas podem entrar nas cadeias alimentares humana e animal por meio de contaminação direta ou indireta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo com a eliminação do fungo durante o processamento, as micotoxinas permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou a ração, se torna contaminado por um fungo toxigênico, que em condições adequadas produz as micotoxinas (Sabino, 1996).

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). A exposição dos seres humanos às micotoxinas ocorre principalmente pela ingestão de produtos vegetais contaminados, bem como pelo consumo de produtos derivados dos animais, tais como leite, queijo, carnes e outros produtos (Smith et al., 1995). Os surtos de micotoxicoses são normalmente sazonais, devido a condições climáticas particulares que favorecem o crescimento fúngico e/ou a produção de toxinas. A umidade e a temperatura são dois fatores críticos. Fatores geográficos, susceptibilidade da variedade e condições de armazenamento também interferem na produção de micotoxinas, sendo que várias toxinas podem ser produzidas simultaneamente (Bullerman et al., 1984).

Os sinais e sintomas das micotoxicoses vão desde lesões de pele, sintomas de hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade, hematotoxicidade ou genototoxicidade, podendo ocasionar à morte. As micotoxinas podem ainda apresentar efeitos mutagênicos, teratogênicos, carcinogênicos ou imunossupressores (Cole & Cox, 1981; JECFA, 2001).

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

1.2 Gênero *Fusarium*

O gênero *Fusarium* é composto por uma grande variedade de espécies fitopatogênicas e sapróbias do solo. Sua posição taxonômica é definida atualmente como pertencente ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Sordariomycetes, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae, Gênero *Fusarium* (Moss, 2002). Como a maioria dos fungos, estes se dispersam através de seus propágulos por ação de chuva, ventos e animais. Como fungos fitopatogênicos,

podem causar cancro em brotos, lesão em galhos e obstrução em inflorescências (Burgess, 1981; Nelson et al., 1994).

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

A característica micromorfológica principal deste gênero é a forma de foice de seus conídios. Eles emergem de células conidiogênicas (fiálides) e podem apresentar-se isoladamente ou agrupados em massas crescendo diretamente do micélio (Fischer et al., 1982; Nelson et al., 1994; Lacaz, 1998).

O fungo *F. graminearum* também conhecido por *Gibberella zeae* (figura 1) é responsável pela fusariose do trigo e do milho e sobrevive na forma de ascósporos nos hospedeiros secundários como as plantas, os grãos e os cereais e em sementes na forma de micélio (McGee, 1988; Reis & Casa, 1996). A disseminação é favorecida em condições de clima quente e úmido pela formação de peritécios sobre os tecidos infectados (Shurtleff, 1992).



Figura 1: Ilustração do fungo *F. graminearum*

Fonte: Mostrom, 2007.

1.3 Zearalenona

1.3.1 Estrutura química e histórico

A zearalenona (ZEA) é um sólido cristalino branco, descrita quimicamente como uma lactona e pode ser produzida por várias espécies de *Fusarium*, sendo que *Fusarium graminearum* e *Fusarium culmorum* são os principais produtores (Zinedine, 2007). Estas espécies são conhecidas por colonizarem cereais e mostrarem tendência a se desenvolverem em baixas temperaturas (OMS, 1983; Hagler et al., 2001).

A denominação zearalenona provém do fungo "*Gibberella zeae*" (forma sexuada do *Fusarium graminearum*), grande produtor desta micotoxina, e também por características da sua estrutura química. A ZEA apresenta uma fluorescência azul-esverdeada, quando excitada com luz ultravioleta de ondas longas de 360 nm e uma fluorescência verde mais intensa quando é excitada com luz ultravioleta de ondas curtas de 254 nm (OMS, 1983).

Sua molécula é constituída por uma lactona ácida resorcílica, sendo o radical "- eno" pela dupla ligação entre os carbonos C1 e C2 e o "- ona" pela cetona no C6 (Urry et al., 1966), como mostra a Figura 2. Apesar de ser uma lactona com um grande anel, compreendendo 13 carbonos, é estável ao rompimento hidrolítico. Isto é atribuído à presença de um grupo metil secundário que impede que ataques nucleofílicos sejam efetivados na carbonila da lactona. A ZEA possui características estrogênicas e possui semelhança química com a estrutura do hormônio estrogênico 17 β -estradiol, como mostra a figura 3.

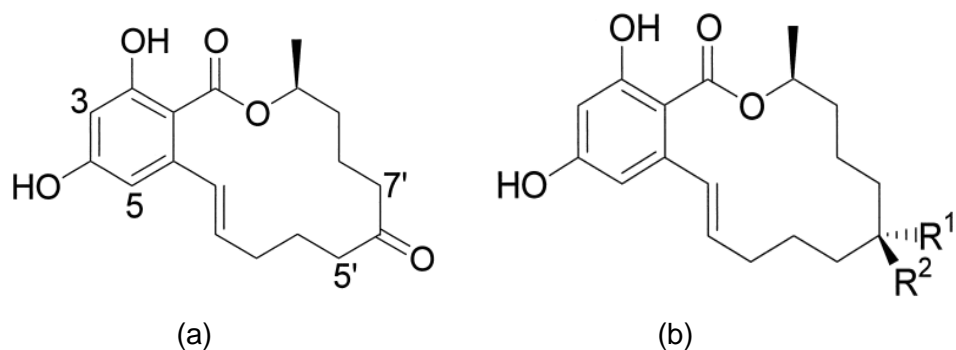


Figura 2: Estrutura química da ZEA (a) e de seus metabólitos (b) α -zearalenol ($R_1=OH$ e $R_2=H$) e β -zearalenol ($R_1=H$ e $R_2=OH$).

Fonte: Bennett & Klich, 2003

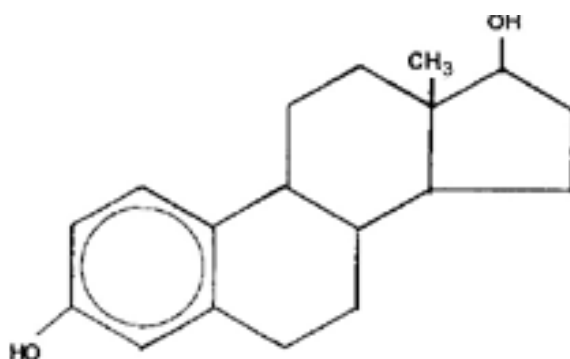


Figura 3: Estrutura química do hormônio estrogênico 17β -estradiol

Fonte: Zinedine et al., 2007

Em 1962, Stob et al. isolaram um metabólito ativo com atividade estrogênica e anabólica a partir de culturas de *G. zeae* (*F. graminearum*). O metabólito ativo encontrado em milho com característica estrogênica foi nomeado zearalenona, anteriormente conhecido como toxina F-2. Assim, a ZEA foi isolada e caracterizada em 1962 devido à síndrome estrogênica que surgiu em suínos alimentados com rações à base de milho contaminado com *Fusarium graminearum* (Mídio & Martins, 2000). Sua estrutura foi elucidada em 1966 e a síntese total surgiu em 1968 (Merck Index, 2006). A sua ocorrência natural em produtos começou a ser estudada em 1968.

Mirocha et al. (1971) observou perdas em alguns rebanhos, e a afirmação de que a mortalidade estaria relacionada com prolapsos vaginais e retais e subsequente septicemias prevalecia, entretanto, a hipótese de que a presença de micotoxinas adicionais também poderiam ser responsáveis pela causa das mortes, não podia ser excluída.

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

A ZEA apresenta grandes efeitos sobre a reprodução e a indução do hiperestrogenismo, sendo os suínos a espécie mais sensível à estes efeitos. O estrogénismo em suínos foi relatado em meados da década de 1920 no centro-oeste dos Estados Unidos (McNutt et al., 1928), pois a condição de inchaço da vagina nas fêmeas jovens e inchaço do prepúcio em machos foi associada ao consumo de milho mofado. O prolapso vaginal e, ocasionalmente, do reto foram observados como efeitos secundários. Com a substituição do milho mofado por um milho de melhor qualidade micológica, os animais recuperavam-se, mas se a exposição ao milho mofado continuasse observava-se eversão do útero e infecções secundárias que levavam à morte de muitos porcos.

1.3.2 Ocorrência e condições de desenvolvimento

A ZEA pode ser produzida em substratos diversos, incluindo trigo, cevada, milho, silagem de milho, arroz, sorgo, e, ocasionalmente, nas forragens. No entanto, o milho é o vegetal mais susceptível à contaminação pelos fungos fitopatogénos do género *Fusarium* (Kumar et al., 2008) que produzem uma série de micotoxinas, sendo a zearalenona (ZEA) frequentemente encontrada neste grão (Salay & Mercadante, 2002). A presença de oxigénio e o teor de umidade são fatores críticos para produção de ZEA. Em culturas de laboratório, o crescimento do género *Fusarium* ocorre

durante um período de 3 semanas em níveis de umidade de mais de 20% e temperatura entre 20 ° C e 25 ° C (Santin et al., 2005).

A grande variação térmica é essencial para produção de micotoxinas por fungos *Fusarium*, como comprovado por Martins & Martins (2002) em estudo *in vitro*. Os autores verificaram que a maior produção de ZEA ocorreu no milho incubado a 28°C por 15 dias e seguidos de queda na temperatura para 12°C. Esta condição é encontrada em regiões de clima temperado da América, Europa e Ásia (Creppy, 2002). No Brasil, estas condições são observadas principalmente nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. A temperatura ótima para a produção de ZEA está entre 12-14°C. Além disso, as variações térmicas que ocorrem entre o dia e a noite também se tornam importantes à produção da zearalenona. Assim, a temperatura é um dos fatores ambientais mais importantes para o crescimento de fungos, produção de toxinas e, conseqüentemente, contaminação de produtos por estas micotoxinas.

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

1.3.3 Toxicocinética

A ZEA é absorvida rapidamente após administração oral (Avantaggiato, et al., 2003; Cavret et al., 2006), sendo que em suínos, a absorção após uma dose de 10 mg/kg de peso vivo é de aproximadamente de 80 a 85 % (Biehl et al., 1993). Após a administração da micotoxina, ela se distribui para os órgãos reprodutores (ovário e útero), tecido adiposo, tecido intersticial e células dos testículos (Ueno et al, 1977;. Kuiper-Goodman et al., 1987). A absorção de zearalenona segue uma cinética de primeira ordem, com K_a (constante cinética) igual a 9,3/horas em ratos (Ramos et al., 1996).

Durante a metabolização em mamíferos ocorre a formação de dois metabólitos isômeros da ZEA, α - e β - zearalenol (Figura 4) que, da mesma forma que a ZEA, possuem ação estrogênica. Estes metabólitos também são produzidos pelos fungos, porém em uma concentração inferior à produzida durante a metabolização da ZEA no organismo animal (Zinedine, 2007).

O conhecimento dos mecanismos de biotransformação tem fundamental importância para o entendimento dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda à micotoxinas. As espécies animais apresentam diferentes sistemas enzimáticos que convertem as substâncias tóxicas em hidrofílicas para serem excretadas do organismo. Em alguns casos os produtos da metabolização têm toxicidade mais acentuada que o próprio substrato, como é o caso da ZEA (D'Mello et al., 1999). Assim, diferentes espécies animais reagem de modo diferente aos efeitos tóxicos da ZEA, o que pode estar relacionado com a biotransformação hepática desta micotoxina. Células microssomais hepáticas de suínos produzem maior quantidade de α -zearalenol, que possui maior atividade estrogênica em comparação com β -zearalanol, enquanto microssomas de frango produzem a maior quantidade de β -zearalenol, que tem menor atividade estrogênica (Malekinejad et al., 2006).

A biotransformação da ZEA é representada esquematicamente na figura 4. Seu metabolismo pode ocorrer por duas vias, a via 1, por hidroxilação; e a via 2, por conjugação ao ácido glicurônico (Olsen et al., 1981) que inativa a ZEA e seus metabólitos. A via 1 consiste na formação de α - e β - zearalenol (α - e β -ZOL) e zearalanona (ZAN), catalisada pelas enzimas 3α - e 3β -

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

O metabólito α -zearalenol possui maior potencial estrogênico que a ZEA e o β -zearalenol (Mirocha et al., 1978; Celius et al., 1999; Minervini et al., 2001; Malekinejad et al., 2006), uma vez que possui maior afinidade pela ligação com os receptores de estrogênio (Celius et al., 1999). Assim, a hidroxilação da zearalenona para α -zearalenol aparentemente é um processo de ativação, enquanto que a produção de β -zearalenol seria um processo de desativação. Em suínos há predominância da conversão da ZEA em α -zearalenol devido à eficiência da enzima 3- α -HDS. Outra particularidade dos suínos é que, comparados às outras espécies animais, possuem menor capacidade de glicuronidação e, portanto, menor capacidade de inativação da ZEA e de seus metabólitos (Fink-gremmels & Malekinejad, 2007). Somadas estas características e particularidades da metabolização da ZEA explica-se o fato desta espécie ser a mais sensível aos efeitos de ordem reprodutiva desta micotoxina. Além disso, os suínos estão diretamente expostos à ZEA por terem

sua base alimentar constituída de milho, sendo especialmente mais sensíveis aos seus efeitos tóxicos comparando-os as outras espécies animais (Malekinejad et al., 2006).

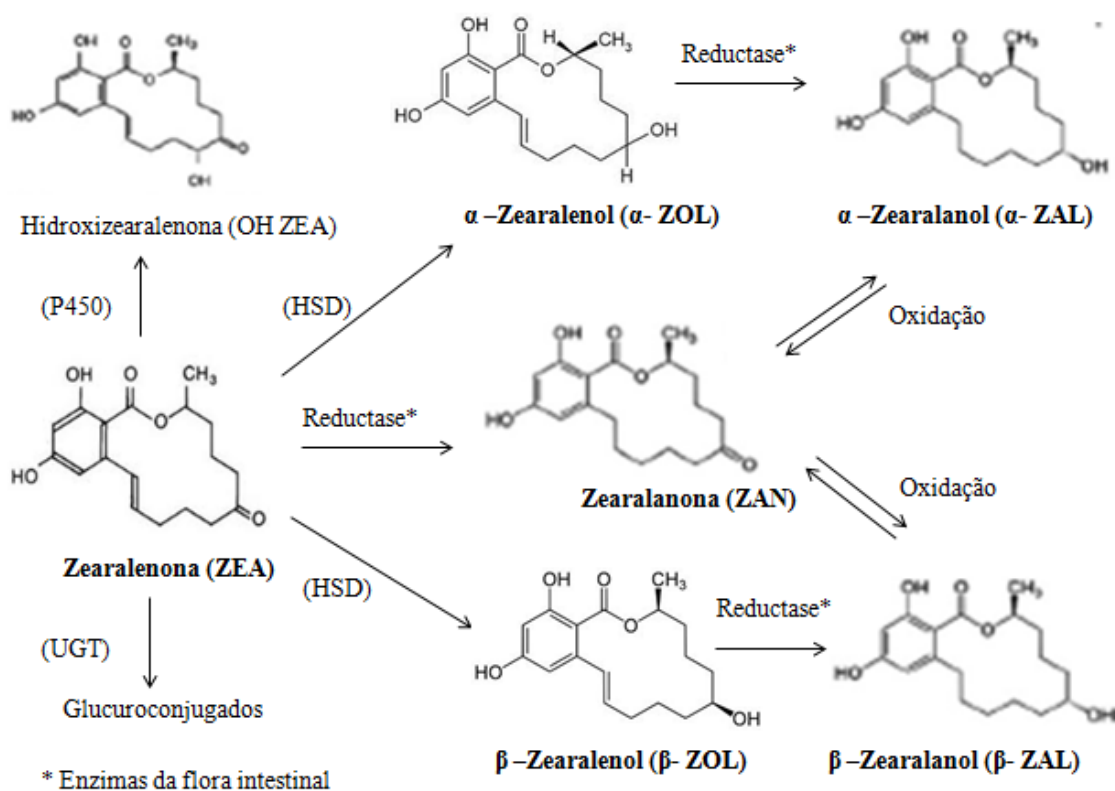


Figura 4: Representação dos metabólitos e principais enzimas envolvidas na biotransformação da ZEA.

Fonte: Marin et al., 2011

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

figura 5. Além disso, a maior parte da zearalenona administrada é excretada dentro de um período de 72 horas para a grande maioria das espécies animais.

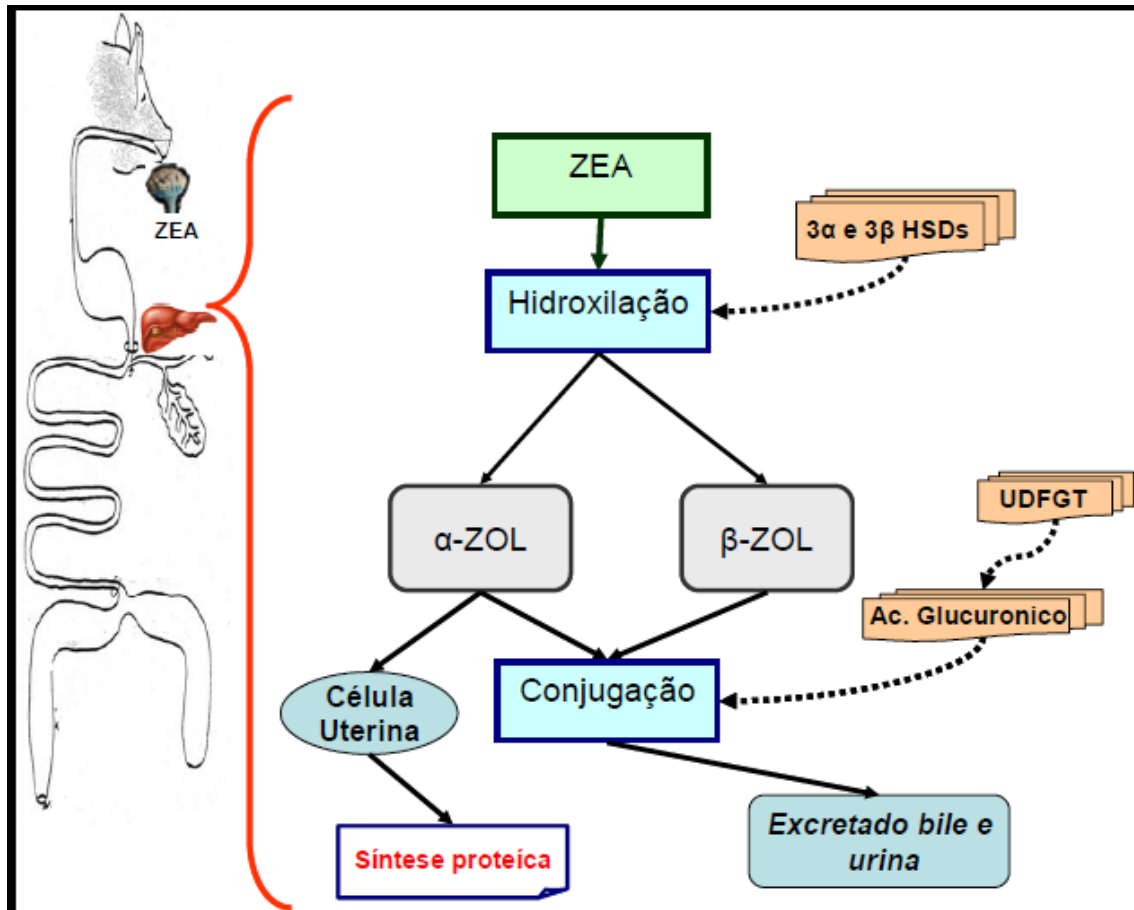


Figura 5: Representação esquemática da metabolização e excreção da ZEA em suínos.

Fonte: Hauschild et al., 2006

1.3.4 Toxicodinâmica

O sistema reprodutivo é um dos principais alvos de toxicidade da ZEA (Minervini e dell'Aquila, 2008; Tiemann e Danicke, 2007). A ação da ZEA ocorre por estímulo aos receptores estrogênicos citoplasmáticos, aumentando a síntese protéica no aparelho reprodutor. Conseqüentemente, ela estimula a secreção das células endometriais, a síntese de proteínas uterinas e resulta em aumento do peso do trato reprodutivo (Gaumy et al., 2001). Especificamente, a

ZEA e seus metabólitos podem interagir diretamente com os sítios de ligação dos receptores citoplasmáticos do hormônio 17β -estradiol e translocar o sítio de ligação destes receptores para o núcleo celular (Katzenellenbogen et al., 1979). No núcleo, a estimulação do RNA leva a síntese de proteínas e sinais clínicos do estrogênio. A toxicidade da ZEA tem sido associada com diminuição da fertilidade, redução da ninhada, alteração do peso da adrenal, tireóide e hipófise na prole, além de alteração nos níveis séricos de progesterona e estradiol (EFSA, 2004).

A ZEA se liga aos receptores estrogênicos (Boyd e Wittliff, 1978; Takemura et al., 2007), resultando em hiperestrogenicidade em várias espécies de animais, especialmente suínos (Green et al., 1990; Minervini e dell'Aquila, 2008) provocando aumento e/ou tumefação da vulva. A intoxicação causa transtornos reprodutivos, como o aumento da infertilidade associada ao estro permanente, atraso no retorno ao estro, persistência de corpo lúteo, falhas na implantação, pseudogestação, anomalias ovarianas, nascimento de leitões fracos (Edwards et al., 1987; Kuiper-goodman et al., 1987; Etienne e Dourmad, 1994; Fink-gremmels & Malekinejad, 2007).

Os estrógenos estão presentes tanto no sistema reprodutor feminino, como no masculino (Claus et al., 1987), e portanto estão envolvidos na estimulação da espermatogênese e síntese de esteróides através da ligação aos receptores de estrógeno (ERs) (Rago et al., 2006; Stabile et al., 2006). Desse modo, em machos expostos à ZEA, pode ocorrer redução de testosterona sérica, da espermatogênese e do peso dos testículos, além da indução de feminização e redução de libido (D'Melo et al., 1999). Em camundongos tratados com ZEA nas doses de 25, 50 e 75 mg/Kg por 7 dias via intraperitoneal houve aumento da vesícula seminal e do peso da glândula preucial do testículo. Além disso, foi observado uma maior porcentagem de espermatozoides anormais, redução de espermatozoides vivos e de sua integridade acrossômica, redução na produção espermática e das células espermatógenicas, além da redução da concentração sérica de testosterona. Fêmeas que copularam com estes camundongos apresentaram uma taxa de concepção menor (Yang et al., 2007).

A ZEA afeta principalmente o sistema reprodutivo, no entanto, ela pode produzir efeitos adicionais. Durante a realização de ensaios in vitro com linhagens de células, a ZEA agiu como um ligante específico à determinados receptores ativando a transcrição de um fator de regulação da expressão de inúmeras enzimas metabolizadoras hepáticas, incluindo a expressão de enzimas do citocromo P450 (Ding et al., 2006), sugerindo que a ZEA possa induzir o metabolismo de drogas.

O quadro clínico das intoxicações pela ZEA varia muito de acordo com quantidade de toxina ingerida, tempo de ingestão e idade, sexo e espécie animal. As micotoxinas em geral, entre elas a ZEA, provocam alterações dos parâmetros hematológicos, além de também possuírem ações hepatotóxicas, imunotóxicas e nefrotóxicas em animais e humanos (Abid-Essefi et al, 2004;. Hassen et al, 2007). Têm sido demonstrado que a ZEA e seus metabólitos possuem efeitos deletérios sobre as funções imunológicas nos seres humanos (Forsell & Pestka, 1985; Vlata et al, 2006), em bovinos (Lioi et al, 2004), frangos (Yegani et al, 2006; Borutova et al, 2008), ratos (Doric et al, 2007) e camundongos (Pestka et al., 1987). (Salah-Abbès et al. 2010) mostrou que a administração de 40 e 80 mg/Kg de ZEA em camundongos Balb/C durante 28 dias provocou redução do peso relativo dos órgãos do sistema imunológico e diminuição do número de linfócitos resultando em atrofia do baço e alteração na produção de citocinas e anticorpos. Entretanto, outros autores (Pestka et al, 1987; Forsell et al, 1986) não relataram efeitos imunotóxicos da ZEA administrada em camundongos, em concentrações tão altas quanto 10 mg/kg (1,5 mg/kg b.w./dia).

A ação hematotóxica da ZEA foi demonstrada nos estudos de Abbès et al. (2006) e Maaroufi et al. (1996), respectivamente, em que camundongos Balb/C e ratos, intoxicados com concentrações superiores a 10 mg/kg de ZEA, observaram disfunção da coagulação, alterações de alguns parâmetros hematológicos como aumento do número das hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais e redução do número de plaquetas. Houve ainda redução do número de linfócitos (Abbès et al., 2006) reforçando a capacidade imunossupressora desta micotoxina, e confirmando os resultados encontrados

por Berek et al. (2001) que também relatou redução de linfócitos T e B em humanos expostos a ZEA.

O estresse oxidativo, como um elemento indutor do desequilíbrio da homeostase dos organismos vivos, também possui relação com a toxicodinâmica das micotoxinas. Nesse sentido, o estudo de enzimas pró-oxidantes e compostos antioxidantes tornam-se vitais para um melhor entendimento sobre os efeitos tóxicos da ZEA já que vários estudos sugerem que o estresse oxidativo parece ser um determinante chave da toxicidade induzida pela ZEA *in vivo* e *in vitro* (Hassen et al., 2007; Abid-Essefi et al., 2009, 2011).

2. Estresse Oxidativo

Radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares que contém um ou mais elétrons desemparelhados no orbital atômico ou moléculas com alto grau de reatividade química que é a causa para o grande número de efeitos prejudiciais ao organismo (Vega, et al., 2002). As espécies reativas do oxigênio (EROS), ânion radical superóxido, radical hidroxila e íon peroxila são os mais relevantes radicais livres de interesse biológico. As proteínas, os lipídios insaturados e os ácidos nucleicos são os principais alvos das reações dos radicais livres.

Em situações normais, os radicais livres são continuamente produzidos e neutralizados pelos sistemas de defesa antioxidante do organismo. Entretanto, quando estes radicais livres são produzidos em altas quantidades, ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, eles podem causar dano celular, representando um mecanismo fundamental para as doenças ou efeitos nocivos em seres humanos, denominado “estresse oxidativo” (Halliwell and Gutteridge, 1999).

Diante disso, os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Halliwell, 1994), que incluem mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos, evitando assim o dano a lipídios, a proteínas e ácidos nucleicos. As principais enzimas antioxidantes são a catalase, a superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona peroxidase (GPx) que

evitam o acúmulo de H_2O_2 e de $O_2\bullet$, e a conseqüente produção de radicais $\bullet OH$, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático específico de defesa. As defesas não-enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathiona e ascorbato, além da albumina sérica, do ácido úrico e do ácido dehidroascórbico) (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Muitos estudos mostram a participação do estresse oxidativo nos efeitos tóxicos induzidos pelas micotoxinas, e atribuem a este fato a hepatotoxicidade característica induzida por elas. Sugere-se que os efeitos tóxicos são mediados pelo aumento da produção de espécies reativas como o ânion superóxido, o radical hidroxil e o peróxido de hidrogênio durante o metabolismo hepático da micotoxina (Towner et al. 2003). Estudos sugerem que a ZEA é metabolizada por enzimas do complexo do citocromo P450 para formar um intermediário reativo, que por sua vez reage com macromoléculas como lipídios, ácidos nucléicos e proteínas, levando a peroxidação lipídica e a lesão celular (Abid-Essefi et al, 2004; Abdel-Wahhab et al, 2005a). As alterações induzidas pela ZEA no sistema antioxidante hepático podem ser consideradas como uma manifestação de aumento do estresse oxidativo causado pela ZEA e/ou seus metabólitos.

De fato, um aumento no estresse oxidativo é considerado um fenômeno importante nos efeitos tóxicos envolvidos na exposição à micotoxinas. Alterações no metabolismo protéico e energético foram descritas em ratos alimentados com dietas contendo níveis elevados de ZEA (Nogowski, 1996; Szkudelska, 2002) além de danos oxidativos (Abid-Essefi et al., 2004). Kouadio et al., (2005), mostrou que a ZEA induz oxidação lipídica e aumenta a produção de malondialdeído em uma linhagem de células cancerígenas de intestino humano Caco-2. Além disso, a incubação de células renais com antioxidantes como as vitaminas A, E e C reduziram a formação de aductos de DNA induzida pela micotoxina (Grosse et al., 1997), e os efeitos citotóxicos dos metabólitos α e β da zearalenona também induzem dano oxidativo, determinado pela quantificação de malondialdeído (Othmen et al., 2008). Recentemente foi demonstrado que o estresse oxidativo, determinado pela atividade da SOD, GPx e conteúdo de vitamina C, é o principal responsável pelos efeitos tóxicos

decorrentes da incubação da toxina em células hepáticas (Stadnik, et al., 2010).

Um aumento na peroxidação lipídica pode alterar a estrutura da membrana celular testicular e então bloquear o metabolismo celular (Ennamany et al., 1995). Estes fatores podem explicar os efeitos negativos da ZEA em espermatozóides e a relação com o estresse oxidativo. Estudos sugerem que a ZEA reduz significativamente a contagem de espermatozóides nos testículos. Uma possível explicação é que estes compostos podem ser tóxicos para a estrutura do tecido testicular (Salah-Abbe` s et al., 2009). Além disso, tem sido demonstrado que a GST tem um papel relevante de proteção durante a espermatogênese (Castellon, 1999) na qual a atividade reduzida da GST e o aumento de ROS levam a danos da membrana de espermatozóides (Gopalakrishnan & Shaha, 1998).

Na literatura, muitos estudos já foram realizados em animais como porcos, ratos (machos e fêmeas) e camundongos Balb-c (machos e fêmeas), no entanto, para o nosso conhecimento não há estudos sobre os efeitos da ZEA em camundongos machos da espécie Swiss e sobretudo, faltam estudos correlacionando os danos reprodutivos com o estresse oxidativo, bem como faltam estudos de toxicidade aguda com a micotoxina. Além disso, este estudo é uma avaliação estimativa e preliminar das propriedades tóxicas da ZEA, que fornecerá informações sobre os riscos para a saúde resultantes de uma exposição de curta duração, visto que a maioria dos estudos utiliza protocolos de toxicidade sub-crônica ou crônica.

Assim, torna-se importante avaliar os prováveis efeitos tóxicos decorrentes da intoxicação aguda induzida pela ZEA em camundongos Swiss machos a fim de possibilitar maior conhecimento sobre os efeitos deletérios desta fusariotoxina, especialmente em relação ao sistema reprodutivo.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os efeitos tóxicos hematológicos, reprodutivos e do estresse oxidativo após exposição oral aguda à micotoxina zearalenona em camundongos machos Swiss.

Objetivos Específicos

- Determinar a proporção do peso dos tecidos em relação ao peso corporal, 48 horas após a administração da ZEA;
- Determinar parâmetros exploratórios e locomotores no teste do campo aberto, 48 horas após a administração da ZEA;
- Determinar parâmetros hematológicos (leucócitos totais, segmentados, bastões, eosinófilos, linfócitos, monócitos e plaquetas) através de esfregaço sanguíneo, 48 horas após a administração da ZEA;
- Determinar o número e motilidade dos espermatozóides, 48 horas após a administração da ZEA;
- Determinar os indicadores não-enzimáticos de estresse oxidativo (conteúdo de vitamina C - AA, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico - TBARS, conteúdo de grupos tióis não-protéicos - NPSH), em fígado, rins e testículos, 48 horas após a administração da ZEA;
- Determinar os indicadores enzimáticos (catalase - CAT, superóxido dismutase - SOD, glutathione-transferase - GST) em fígado, rins e testículos, 48 horas após a administração da ZEA.

PARTE II

CAPÍTULO I.

**Possible role for glutathione-S-transferase in the
oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration
in Swiss albino mice**

Silvana Peterini Boeira, Carlos Borges Filho, Lucian Del’Fabbro, Luiz Fernando
Freire Royes, Cristiano Ricardo Jessé, Mauro Schneider Oliveira, Ana Flávia
Furian

Submetido à *Toxicon*.

Submission Confirmation

----- Forwarded message -----
From: **Toxicon** <toxcon@elsevier.com>
Date: 2012/1/18
Subject: Submission Confirmation
To: urian.anafavia@gmail.com

Dear Ana,

Your submission entitled "Possible role for glutathione-S-transferase in the oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration in Swiss albino mice" has been received by Toxicon

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/toxcon/>.

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/TOXCON/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Toxicon

**Possible role for glutathione-S-transferase in the
oligozoospermia elicited by acute zearalenone administration
in Swiss albino mice**

*Silvana Peterini Boeira^{a, b}, Carlos Borges Filho^b, Lucian Del’Fabbro^b,
Luiz Fernando Freire Royes^c, Cristiano Ricardo Jessé^{a, b}, Mauro
Schneider Oliveira^{a, b}, Ana Flávia Furian^{a, d*}*

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

^b *Universidade Federal do Pampa, Campus Itaqui, 97650-000 Itaqui, RS, Brasil*

^c *Departamento de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil*

^d *Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brasil*

*Corresponding author: Prof^a. Dr^a. Ana Flávia Furian

Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos,

Universidade Federal de Santa Maria

Prédio 43, Sala 4217

97105-900 Santa Maria, RS, BRASIL.

PHONE: +55 (55) 3220 8254

e-mail: furian.anafllavia@gmail.com

Abbreviations: AA, Ascorbic acid determination; CAT, Catalase; CDNB, 1-chloro-2,4 dinitrobenzene; DTNB, 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid); ERs, estrogens receptors; ER α , estrogen receptors α ; ER β , estrogen receptors β ; GSH, reduced glutathione; GST, Glutathione S-transferase; GSTM1, Glutathione S-transferase M1; GSTM3, Glutathione S-transferase M3; GSTM5, Glutathione S-transferase M5; LD50, Letal dose; MDA, malondialdehyde; NPSH, Non protein thiols; ROS, reactive oxygen species; SOD, superoxide dismutase; TBA, Thiobarbituric acid; TBARS, Thiobarbituric acid reactive substances; TCA, trichloroacetic acid; ZEA, Zearalenone; α -ZEA, α -zearalanol; α -ZOL, α -zearalenol; β -ZEA, β -zearalanol; β -ZOL, β -zearalenol.

Abstract

Zearalenone (ZEA) is a non-steroidal estrogenic mycotoxin produced by several species of *Fusarium*, commonly found in the soil in temperate and warm countries and is frequent contaminant of cereal crops worldwide. Accordingly, it has been implicated in several mycotoxicosis in farm animals and in humans, but the underlying mechanisms remain largely unknown. Therefore, the current study was aimed to investigate the effect of an acute dose of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on reproductive and hematological parameters, as well as on markers of oxidative stress in liver, kidney and testes in mice. Adult Swiss albino male mice were exposed to a single oral injection of ZEA, and 48 hours thereafter behavioral and biochemical tests were performed. No differences in locomotor or exploratory activity were observed in the open-field test. On the other hand, ZEA increased the number of leukocytes, segmented neutrophils, sticks, eosinophils, monocytes and decreased platelets and lymphocytes number. Moreover, ZEA drastically reduced the number and motility of live spermatozoa. Additionally, while levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), non-protein thiols (NPSH) and ascorbic acid in liver, kidney and testes were not altered by ZEA administration, superoxide dismutase activity increased in all tissues evaluated, catalase activity increased in the kidney, and glutathione-S-transferase activity decreased in kidney and testes. In summary, we showed that ZEA have acute toxic effects mainly in reproductive system of adult male Swiss albino mice and its effect probably is related to a reduced activity of GST and increased in SOD activity in testes.

Key-words: mycotoxin, spermatozoa, testes, liver, kidney, oxidative stress

1. Introduction

Zearalenone (ZEA) is a non-steroidal estrogenic mycotoxin produced by the fungi *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* (Langseth et al., 1998; Marasas et al., 1984), which are commonly found in the soil in temperate and warm countries and are frequent contaminants of cereal crops worldwide (Zinedine et al., 2007). ZEA is rapidly absorbed following oral intake and, during subsequent metabolism mainly in the liver and intestine, it is transformed into α - and β -zearalenol (α - and β -ZOL), α - and β -zearalanol (α - and β -ZEA) and zearalanone (ZEA), all of which are subsequently conjugated to glucuronic acid (Gromadzka et al., 2008). A variety of other tissues, including the kidney, testis, prostate, hypothalamus and ovary, also contain the major enzymes (3 α - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase) able to metabolize mycotoxins (Olsen et al., 1981). ZEA is genotoxic and responsible of a potent reproductive toxicity in humans and animals (Abbes et al., 2007; Salah-Abbes et al., 2009a; Tomaszewski et al., 1998). ZEA has been shown to be immunotoxic (Abbes et al., 2006; Ben Salah-Abbes et al., 2008), hepatonephrotoxic (Salah-Abbes et al., 2009b) and apoptotic (Abid-Essefi et al., 2003).

Such toxic effects of ZEA and its metabolites have been ascribed primarily to its chemical structure that resembles that of naturally occurring estrogens (Gromadzka et al., 2008), but the exact underlying mechanisms remain largely unknown. In this context, oxidative stress has been considered to play an important role in the toxic effects after mycotoxins exposure. In fact, oxidative damage has been described in rats fed with diets containing high levels of ZEA (Becci et al., 1982). Moreover, it has been demonstrated that ZEA and its metabolites induces lipid oxidation and increases the production of

malondialdehyde in several cell lines (Hassen et al., 2007; Kouadio et al., 2005; Othmen et al., 2008). Furthermore, antioxidants such as vitamins A, E and C reduced the formation of DNA adducts induced by this mycotoxin in renal cells (Szkudelska et al., 2002).

The reproductive system is a major target of ZEA toxicity (Minervini and Dell'Aquila, 2008; Tiemann and Danicke, 2007). ZEA has strong estrogenic effects and it is mainly distributed in reproductive organs, particularly uterus and ovaries. ZEA and its metabolites have been shown to bind competitively to estrogen receptors (ER α and ER β) in a number of *in vitro* or *in vivo* systems and to activate transcription of estrogen responsive genes (Mehmood et al., 2000; Turcotte et al., 2005). So, it is frequently implicated in hyperestrogenism and other reproductive disorders in laboratory and farm animals (Green et al., 1990; Kuiper-Goodman et al., 1987; Lopez et al., 1988; Minervini and Dell'Aquila, 2008). In humans, ZEA was associated to precocious pubertal changes, endometrial adenocarcinoma and hyperplasia in women (Tomaszewski et al., 1998). Moreover, ZEA was found to be hepatotoxic, to disturb haematological parameters, and it was associated to several alterations of immunological parameters in humans and rodents (Abid-Essefi et al., 2004; Hassen et al., 2007). In experimental chronic studies, ZEA caused alterations in the reproductive tract of laboratory animals (mice, rats, and pigs) and farm animals. It decreased fertility, reduced litter size, changed weight of adrenal, thyroid and pituitary glands and changed serum levels of progesterone and estradiol ((EFSA), 2004). Moreover, it has been demonstrated that while small amounts of ROS have been shown to be required for several functions of spermatozoa, their excessive levels can negatively impact the quality of

spermatozoa and impair their overall fertilising capacity (Tvrda et al., 2011). Regarding male fertility, increased levels of ROS have been correlated with decreased sperm motility (Eskenazi et al., 2003), increased sperm DNA damage (Armstrong et al., 1999), sperm cellular membrane lipid peroxidation (Aitken, 1995). Nevertheless, to the best of our knowledge, there are no studies investigating the acute effects of ZEA on male reproductive system and fertility and the possible association of oxidative stress. Therefore, this study aims to evaluate the effects of a single acute dose of ZEA on reproductive and hematological parameters, as well as on markers of oxidative stress in liver, kidney and testes of mice.

2. Material and methods

2.1. Animals and reagents

Twenty male Swiss albino mice (25–30 g in weight and 90 days old) from our own breeding colony were used. Animals were housed in groups of 5 in Plexiglas cages (41 cm × 34 cm × 16 cm) with the floor covered with sawdust. They were kept in a room with light-dark cycle of 12 h with the lights on between 7:00 and 19:00 h and temperature controlled (20–25 °C) and received water and food *ad libitum*.

The animals were maintained and used in accordance with the guidelines of the Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources (process #071/2011) of the Federal University of Santa Maria, Brazil.

Zearalenone (ZEA), Thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), reduced glutathione (GSH), 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 1-chloro-2,4 dinitrobenzene (CDNB), Epinephrine bitartrate salt, glycine, tris,

were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All other chemicals used were obtained from standard commercial suppliers. The stain used for the blood smear was the quick Romanowesky (Laborclin Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brazil). ZEA was prepared in olive oil, immediately before administration.

2.2. Experimental design and sampling

Mice were weighed and randomly divided in two groups which received one ZEA administration at a dose of 40 mg/kg - 8% of LD50 (Zourgui et al., 2008) or olive oil by gavage (10 ml/kg). Forty eight hours after ZEA or vehicle administration the animals received a dose of pentobarbital (180 mg/kg, i.p.), and blood was collected by cardiac puncture into tubes containing heparin (1 UI/ μ l). The liver, kidneys and testes were removed, weighed and homogenized in Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 for the determination of enzymatic and non enzymatic indicators of oxidative stress. The epididymis were weighed and used for determining the number and motility of spermatozoa.

2.3. Open-field test

The open field task is a simple assessment used to determine general activity levels, gross locomotor activity and exploration habits in rodents. Two days (48h) after the treatment with ZEA or vehicle, mice were submitted to the open field test. Mice were placed in a wooden box (20 x 30 cm) with the floor divided in twenty-one identical squares, and the number of squares crossed with all paws, the number of rearings and the time of cleaning were counted during 10 minutes.

2.4. Body weight and vital organs relative weight

In order to evaluate any possible toxic action of acute ZEA administration, the body and vital organs relative weight were determined. Mice were weighted before, and two days (48 h) after the treatment with ZEA and some vital and reproductive organs (lungs, liver, spleen, kidneys, testes and epididymis) were weighted relatively to the body weight.

2.5. Blood cells

Total leucocyte count was performed using 25 μ l of blood and 500 μ l of solution Turkey in a Neubauer chamber with the aid of optical microscope with a 40x objective (Nikon Eclipse 50i). Subsequently, we applied the technique of blood smears for differential counts of neutrophils (segmented and sticks), eosinophils, lymphocytes and monocytes with 5 μ l blood. After performing the same, the slides were stained (panotico fast) and viewed under a microscope according to the method described by (Failace, 2009).

2.6. Number and motility of spermatozoa

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

2.7. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) determination

Lipid peroxidation was estimated by measuring TBARS and expressed in terms of malondialdehyde (MDA) content, according to the method of (Ohkawa et al., 1979). In this method, MDA, an end product of fatty acid peroxidation, reacts with thiobarbituric acid (TBA) to form a colored complex. TBARS content was estimated in a medium containing the supernatant fraction of liver, kidneys or testes, 0.05 ml of 8.1% SDS, 0.2 ml of acetic acid buffer (2.5 M, pH 3.4), and 0.38 ml of 0.81% thiobarbituric acid (TBA). The mixture was finally made up to 1 ml with type I ultrapure water and heated at 95°C for 90 min in a water bath using a glass ball as a condenser. After cooling to room temperature, absorbance was measured in the supernatant at 532 nm. Results were calculated as nmol MDA/ mg of protein and expressed as percent of control.

2.8. Non protein thiols (NPSH) determination

NPSH levels of liver, kidney and testes samples were determined according to the method proposed by (Ellman, 1959) with some modifications. Samples were precipitated with TCA (10%) and subsequently centrifuged at 3 000 g for 10 min. After the centrifugation, the supernatant fraction (60 µl) was added to a reaction medium containing potassium phosphate buffer (1 M, pH 7.4) and DTNB (10 mM). NPSH levels were measured spectrophotometrically at 412 nm. Results were calculated in relation to a standard curve constructed with cystein and corrected by the protein content. Results were calculated as nmol NPSH/mg of protein and expressed as percent of control.

2.9. Ascorbic acid determination (AA)

Hepatic, renal and testicular ascorbic acid determination was performed as described by (Jacques-Silva et al., 2001). Protein was precipitated in 10 V of a cold 5% trichloroacetic acid solution. An aliquot of sample (300 μ L), in a final volume of 575 μ L of the solution, was incubated with TCA 13,3%, and a color reagent containing dinitrophenyl hydrazine, thiourea and CuSO_4 , at 37 °C for 3 h, then 500 μ L H_2SO_4 65% (v/v) was added to the medium. The reaction product was determined spectrophotometrically at 520 nm as μ g ascorbic acid/g tissue and expressed as percent of control.

2.10. Enzyme assays

2.10.1. Catalase (CAT) activity

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

2.10.2. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was determined in liver, kidney and testes, according to the method described by (Misra and Fridovich, 1972) . This method is based on the ability of SOD in inhibiting autoxidation of adrenaline to adrenochrome. Briefly, the supernatant fraction (20–60 μ l) was added to a medium containing glycine buffer (50 mM; pH 10.5) and adrenaline (1 mM). The kinetic analysis of SOD

was started after adrenaline addition, and the color reaction was measured at 480 nm. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme required to inhibit the rate of epinephrine autoxidation by 50% at 30 °C, and results were expressed as Units (U)/mg of protein.

2.10.3. Glutathione S-transferase (GST) activity

GST activity was assayed spectrophotometrically at 340 nm by the method of (Habig et al., 1974) . The reaction mixture contained an aliquot of supernatant of liver, kidney or testes, 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4), 100 mM GSH and 100 mM CDNB, which was used as substrate. The enzymatic activity was expressed as nmol CDNB/min/mg of protein.

2.11. Protein determination

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

2.12. Statistical Analysis

Graphpad prism 5 software was used for statistical analysis and for plotting graphs. Statistical analysis was carried out by the Student's *t* test, and *P* <0.05 was considered significant. All data are reported as mean and S.E.M.

3. Results

The aim of this study was to investigate the acute toxic effects of ZEA 48 h after a single oral administration in Swiss albino male mice. In order to investigate whether this mycotoxin affects motor and exploratory behavior in

mice, animals were visually observed in open field paradigm. Table 1 shows the effect of ZEA on open-field performance. No significant differences in locomotor or exploratory activity (crossing, rearing and cleaning) were observed in ZEA-treated mice when compared with control group ($t(18)=1.386$, $P=0.1827$; $t(18)=0.3373$, $P=0.7398$; $t(18)=1.070$, $P=0.2989$, respectively).

The effect of ZEA on percent of body weight gain did not differ among groups (data not shown). The effect of acute administration of ZEA on isolated weight of vital and reproductive organs was also evaluated. Mice organs (kidneys, liver, lungs, spleen, testes and epididymis) were visually observed *ex vivo* for any signs of damage and weighed relatively to the body weight. No significant differences were observed when compared to control group, with exception of significantly increase in liver weight ($t(18)=2.478$, $P=0.0234$; Table 2).

Figure 1 shows the effect of ZEA on number of blood cells. Hematotoxic effect of ZEA was evident after 48 hours of exposition to a single dose of mycotoxin. ZEA increased the number of leukocytes ($t(18)=9.552$, $P<0.0001$; Figure 1A), segmented neutrophils ($t(18)=4.354$, $P=0.0004$; Figure 1B), sticks ($t(18)=2.178$, $P=0.043$; Figure 1C), eosinophils ($t(18)=2.278$, $P=0.0352$; Figure 1D) and monocytes ($t(18)=2.530$, $P=0.021$; Figure 1E). On the other hand, ZEA decreased lymphocytes ($t(18)=5.050$, $P<0.0001$; Figure 1F) and platelets number ($t(18)=7.409$, $P<0.0001$; Figure 1G).

In addition to the hematological effects of ZEA, we evaluated the number and motility of spermatozoa after ZEA administration, since there are only a few evidences that the male reproductive system is affected by acute ZEA

treatment. Interestingly, ZEA significantly reduced the number of spermatozoa ($t(18)=10.35$, $P<0.0001$; Figure 2A) and its motility ($t(18)=6.385$, $P<0.0001$; Figure 2B).

In order to evaluate the role of oxidative stress on the effects induced by acute administration of ZEA, we measured several enzymatic and non-enzymatic indicators of oxidative stress in liver, kidneys and testes. Statistical analyses revealed that levels of non-enzymatic markers for oxidative stress, TBARS ($t(18)=1.157$, $P=0.2625$; $t(18)=0.050$, $P=0.9599$; $t(18)=0.7188$, $P=0.4815$), NPSH ($t(18)=1.443$, $P=0.1661$; $t(18)=1.310$, $P=0.2068$; $t(18)=1.008$, $P=0.3266$) and ascorbic acid ($t(18)=0.5741$, $P=0.5730$; $t(18)=1.365$, $P=0.1891$; $t(18)=0.9553$, $P=0.3521$) were not altered by ZEA administration (Table 3).

On the other hand, activities of enzymatic markers for oxidative stress were altered by ZEA treatment. In fact, catalase activity increased in kidneys ($t(17)=2.603$, $P=0.0185$) (Figure 3), while SOD activity increased in the liver ($t(18)=2.502$, $P=0.0228$), kidney ($t(18)=2.632$, $P=0.0175$) and testes ($t(17)=2.285$, $P=0.0347$) (Figure 4). However, ZEA decreased GST activity in the kidney ($t(17)=2.277$, $P=0.036$) and testes ($t(17)=2.151$, $P=0.0462$) (Figure 5).

4. Discussion

ZEA is a fusariotoxin produced mainly by *Fusarium* species that grow on foodstuffs at high incidence in several countries (Eriksen, 1998). Since ZEA is a potent toxin and may cause a risk to animal and human health, it is important to investigate the acute harmful effects of this mycotoxin.

In the present study we showed that acute ZEA administration caused deleterious hematologic effects (Figure 1) and drastically reduced the number and motility of live spermatozoa (Figure 2) in male Swiss albino mice. The role of oxidative stress in the toxic effects of ZEA was also investigated. Interestingly, this mycotoxin decreased GST activity in the testes and kidney (Figure 5B-C), increased SOD activity in the liver, kidney and testes (Figure 4A-C), and increased CAT activity in the kidney (Figure 3B).

Intracellular accumulation of reactive oxygen species can arise from toxic insults and can perturb the cell's natural antioxidant defense system resulting in damage to all major classes of biological macromolecules. During the last decades, the oxidative stress has been pointed out as major component of several biological and pathological processes like aging, inflammation, carcinogenesis and several other diseases (Halliwell, 1999). Additionally, some reports suggest that oxidative stress is a key determinant of ZEA induced toxicity *in vivo* and *in vitro* (Abid-Essefi et al., 2009; Abid-Essefi et al., 2011; Ben Salah-Abbes et al., 2008; Hassen et al., 2007; Salah-Abbes et al., 2009a).

In this context, both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses are fundamental to prevent oxidative stress and may also indicate the level of protection against foreign agents. In the present study, we found that acute ZEA treatment significantly increased catalase activity in the kidney and SOD activity in the liver, kidney and testes, suggesting compensatory increases in antioxidant enzyme activity in attempt to prevent oxidative damage to cells and macromolecules. In this context, such assumption could be supported by the fact that levels of non-enzymatic antioxidant defenses (NPSH and AA) and of a marker of lipid peroxidation (TBARS) did not change significantly in liver, kidney

or testes after acute ZEA administration. Altogether, these results may suggest that ZEA affects enzymatic rather than non-enzymatic markers of oxidative stress, and that increased SOD and CAT activities in fact may counteract oxidative damage and depletion of non-enzymatic antioxidant defenses. In agreement with our results, (Stadnik, 2010) have shown increased SOD activity in the liver after 10 days of ZEA (200 and 500 µg/kg, p.o.) administration, and that ascorbic acid content in rat liver was unchanged after 24 h or 10 days of ZEA administration. In addition, catalase activity increased in the liver and kidney of mice 24 hours after ZEA (40 mg/kg, i.p.) administration (Zourgui et al., 2008). On the other hand, orally treated male Balb/c mice treatment for 28 days with ZEA (40 mg/kg, i.p.) decreased glutathione peroxidase, SOD and CAT activities in testes (Salah-Abbes et al., 2009a). These apparent conflicting data can be explained by the differences in animal species, strain, sex as well as routes, schedules and doses of ZEA used. Regarding this point, (Malekinejad et al., 2006) has reported differences between species in hepatic biotransformation of ZEA in pig, sheep, cattle, chicken and rat. Thus, the liver biotransformation of ZEA could be related to the variation in liver weight of mice treated with ZEA compared to control. However, some studies showed that ZEA increases the weight of testis, epididymis, prostate and seminal vesicle reinforcing that more studies are necessary to elucidate the effects of mycotoxin intoxication in a variety of species, strains and tissues (Salah-Abbes et al., 2009a; Yang et al., 2007).

Studies in various female species (rodents, rabbits, pigs, monkeys) including man have shown that ZEA has estrogenic activity and impairs reproduction, including reproductive organs and their function, leading to

hyperestrogenism. As well as in the female reproductive system, estrogens exist in the male reproductive system (Claus et al., 1987) and are involved in stimulating spermatogenesis and steroid synthesis by binding to estrogen receptors (ERs), including ER α and ER β (Rago et al., 2006; Stabile et al., 2006). Furthermore, testicular spermatozoa count is an important indicator for investigators to detect the adverse effects of various factors on spermatogenesis (Ban et al., 1995). In our study, there was a significant decrease in spermatozoa count in epididymis homogenates as well as reduced spermatozoa motility. (Kim et al., 2003) have reported that a single dose of ZEA (5 mg/kg, i.p.) is able to induce testicular germ cell apoptosis in rats in a time-dependent and stage-specific pattern. Yang et al., (2007), shows that the treatment with ZEA or α -ZOL at 0, 25, 50 and 75 mg/kg i.p. once a day for 7 consecutive days, in Kunming male mice decreased the number of live spermatozoa, and increased the number of abnormal spermatozoa. In addition, low pregnancy rate was observed when females were mated with ZEA or α -ZOL exposed males. (Salah-Abbes et al., 2009a) showed that in a chronic protocol (40 mg/kg, p.o. for 28 consecutive days) the number and motility of spermatozoa decreased in Balb/c mice. These studies suggest that ZEA reduces the number and motility of spermatozoa independently of the experimental protocol and mice strain.

Although is difficult to point out the exactly mechanisms underlying the toxicity of ZEA to spermatozoa, it is interesting to note that GST activity seems to be a critical factor. To our knowledge, this is the first study that shows a decreased GST activity in testes after ZEA administration. Glutathione S-transferase plays an important role in the biotransformation and detoxification of

many xenobiotics, and semen contains significant amount of GST, important for sperm protection against oxidative stress (Mann et al., 2000). Reduced activity of GST and increased ROS levels lead to sperm membrane damage (Gopalakrishnan and Shaha, 1998). It has been also demonstrated that GST has a relevant protective role during spermatogenesis (Castellon, 1999) and that GST Mu-1 gene (GSTM1) is a critical isozyme in the prevention of oxidative stress in sperm (Chen et al., 2002). In fact, GSTM1, GSTM3 and GSTM5 gene polymorphisms have been shown to predispose to male infertility after varicocele, by decreasing spermatozoa motility and concentration and causing oxidative damage to spermatozoa DNA (Chen et al., 2002; Okubo et al., 2005). In addition, a decrease in spermatozoa count and motility and an increase in dead spermatozoa in GSTM1 null humans was observed (Vani, 2010), further suggesting a critical role for GST activity in infertility and oligozoospermia.

Regarding the effects of ZEA on blood cell counts, it has been demonstrated that ZEA is hematotoxic, immunotoxic and genotoxic in Balb/c mice (Abbes et al., 2007; Abbes et al., 2006). In addition, (Forsell et al., 1986; Pestka et al., 1987) have shown similar effects of ZEA on hematological parameters of the immune system in B6C3F1 mice. In the present study ZEA increased leukocytes number concomitantly to a decrease in lymphocyte counts, reinforcing the ZEA potential to cause acute immune toxicity. Regarding this point, (Berek et al., 2001) has shown that ZEA caused immunosuppression by depressing T or B lymphocyte activity. Our results are also in agreement with those by (Swamy et al., 2004), who have demonstrated that ZEA-contaminated diet linearly reduced B-cell count in broiler chickens. In addition, a single intravenous administration of ZEA (15 mg/ml) led to the formation of

pronounced abnormalities in lymphocyte membrane phospholipid metabolism in rats (Karagezian, 2000). Notwithstanding, the decline in platelets count suggests a possible detrimental effects of ZEA on blood coagulation process, as previously suggested by (Maaroufi et al., 1996).

In summary, we showed that the mycotoxin ZEA induces acute reproductive toxicity in male Swiss albino mice, as demonstrated by changes in spermatozoa count and motility. In addition, it is suggested that the effects of ZEA may be closely related to the decreased activity of GST in testes. In conclusion, these results indicate that even a single acute administration of ZEA may cause deleterious effects on the male reproductive system, and that GST activity could be a target for preventing such effects.

Acknowledgements

Research supported by FAPERGS (grants #10/0685-8 and # 11/1630-1).

Luiz Fernando Freire Royes and Lucian Del Fabbro are the recipients of CNPq fellowships. Silvana Peterini Boeira is the recipient of a CAPES fellowship.

Carlos Borges Filho is the recipient of FAPERGS fellowships.

Figure Legends

Figure 1. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on blood parameters. Number of leukocytes (A), segmented (B), sticks (C), eosinophils (D), monocytes (E), lymphocytes (F) and platelets (G) 48 h after a single oral administration. Data are mean + S.E.M. for n= 10 animals in each group. * Indicates a significant difference ($p<0.05$) compared with olive oil group.

Figure 2. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on number of spermatozoa in epididymis (A) and percentage of motile spermatozoa (B) 48 h after a single oral administration. Data are mean + S.E.M. for n= 10 animals in each group. * Indicates a significant difference ($p<0.05$) compared with olive oil group.

Figure 3. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on CAT activity in liver (A), kidney (B) and testes (C) 48 h after a single oral administration. Data are mean + S.E.M. for n= 9-10 animals in each group. * Indicates a significant difference ($p<0.05$) compared with olive oil group.

Figure 4. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on SOD activity in liver (A), kidney (B) and testes (C) 48 h after a single oral administration. Data are mean + S.E.M. for n= 9-10 animals in each group. * Indicates a significant difference ($p<0.05$) compared with olive oil group.

Figure 5. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on GST activity in liver (A), kidney (B) and testes (C) 48 h after a single oral administration. Data are mean + S.E.M.

for n= 9-10 animals in each group. * Indicates a significant difference ($p<0.05$) compared with olive oil group.

Table 1. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on open-field parameters 48h after administration. Data are mean \pm S.E.M. for n= 10 animals in each group.

Table 2. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) 48 h after a single oral administration on organs relative weight. Data are mean \pm S.E.M. for n= 10 animals in each group.* Indicates a significant difference ($p<0.05$) compared with olive oil group.

Table 3. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) 48h after administration on TBARS, NPSH and AA content in liver, kidney and testes 48h after administration. Data are expressed as percent of control, and represents the mean \pm S.E.M. for n= 10 animals in each group.

References

- Abbes, S., Ouanes, Z., Salah-Abbes, J.B., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R., Bacha, H., 2007. Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with Zearalenone. *Mutat Res* 631, 85-92.
- Abbes, S., Salah-Abbes, J.B., Ouanes, Z., Houas, Z., Othman, O., Bacha, H., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R., 2006. Preventive role of phyllosilicate clay on the Immunological and Biochemical toxicity of zearalenone in Balb/c mice. *Int Immunopharmacol* 6, 1251-1258.
- Abid-Essefi, S., Baudrimont, I., Hassen, W., Ouanes, Z., Mobio, T.A., Anane, R., Creppy, E.E., Bacha, H., 2003. DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology* 192, 237-248.
- Abid-Essefi, S., Bouaziz, C., Golli-Bennour, E.E., Ouanes, Z., Bacha, H., 2009. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on cultured human Caco-2 cells. *J Biochem Mol Toxicol* 23, 233-243.
- Abid-Essefi, S., Ouanes, Z., Hassen, W., Baudrimont, I., Creppy, E., Bacha, H., 2004. Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicol In Vitro* 18, 467-474.
- Abid-Essefi, S., Zaied, C., Bouaziz, C., Salem, I.B., Kaderi, R., Bacha, H., 2011. Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against zearalenone toxicity mediated by oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol*.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Aitken, R.J., 1995. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fertil Dev* 7, 659-668.
- Armstrong, J.S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W.J., Sikka, S.C., 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radic Biol Med* 26, 869-880.

Ban, Y., Komatsu, T., Kemi, M., Inagaki, S., Nakatsuka, T., Matsumoto, H., 1995. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. *Exp Anim* 44, 315-322.

Becci, P.J., Voss, K.A., Hess, F.G., Gallo, M.A., Parent, R.A., Stevens, K.R., Taylor, J.M., 1982. Long-term carcinogenicity and toxicity study of zearalenone in the rat. *J Appl Toxicol* 2, 247-254.

Ben Salah-Abbes, J., Abbes, S., Houas, Z., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R., 2008. Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of radish extract (*Raphanus sativus*). *J Pharm Pharmacol* 60, 761-770.

Berek, L., Petri, I.B., Mesterhazy, A., Teren, J., Molnar, J., 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol In Vitro* 15, 25-30.

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

Castellon, E.A., 1999. Influence of age, hormones and germ cells on glutathione S-transferase activity in cultured Sertoli cells. *Int J Androl* 22, 49-55.

Chen, S.S., Chang, L.S., Chen, H.W., Wei, Y.H., 2002. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod* 17, 718-725.

Claus, R., Hoang-Vu, C., Ellendorff, F., Meyer, H.D., Schopper, D., Weiler, U., 1987. Seminal oestrogens in the boar: origin and functions in the sow. *J Steroid Biochem* 27, 331-335.

Ellman, G.L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 82, 70-77.

Eriksen, G.S., Alexander, J., 1998. Fusarium toxins in cereals – a risk assessment. . TemaNord, Copenhagen, pp. pp. 7-27 and 45-58.

(EFSA), F.S.A., 2004. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. www.efsa.eu.int.

Eskenazi, B., Wyrobek, A.J., Slotter, E., Kidd, S.A., Moore, L., Young, S., Moore, D., 2003. The association of age and semen quality in healthy men. *Hum Reprod* 18, 447-454.

Failace, R., Failace, R., Fernandes, F., 2009. Hemograma, Manual de Interpretação., 5° edição ed. Artmed S.A.

Forsell, J.H., Witt, M.F., Tai, J.H., Jensen, R., Pestka, J.J., 1986. Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol* 24, 213-219.

Freund, M., Carol, B., 1964. Factors Affecting Haemocytometer Counts of Sperm Concentration in Human Semen. *J Reprod Fertil* 8, 149-155.

Gopalakrishnan, B., Shaha, C., 1998. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Lett* 422, 296-300.

Green, M.L., Diekman, M.A., Malayer, J.R., Scheidt, A.B., Long, G.G., 1990. Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. *J Anim Sci* 68, 171-178.

Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J., Golinski, P., 2008. Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal* 1, 209-220.

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

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, Oxford.

Hassen, W., Ayed-Boussema, I., Oscoz, A.A., Lopez Ade, C., Bacha, H., 2007. The role of oxidative stress in zearalenone-mediated toxicity in Hep G2 cells: oxidative DNA damage, glutathione depletion and stress proteins induction. *Toxicology* 232, 294-302.

Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., Flores, E.M., Rocha, J.B., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol Toxicol* 88, 119-125.

Karagezian, M.K., 2000. [Effect of the mycotoxin zearalenone on the metabolism of membrane phospholipids of rat lymphocytes]. *Ukr Biokhim Zh* 72, 105-109.

Kim, I.H., Son, H.Y., Cho, S.W., Ha, C.S., Kang, B.H., 2003. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. *Toxicol Lett* 138, 185-192.

Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D., Creppy, E.E., 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* 213, 56-65.

Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 7, 253-306.

Langseth, W., Bernhoft, A., Rundberget, T., Kosiak, B., Gareis, M., 1998. Mycotoxin production and cytotoxicity of *Fusarium* strains isolated from Norwegian cereals. *Mycopathologia* 144, 103-113.

Lopez, T.A., Odriozola, E.R., Milano, G.D., Sobredo, J.C., Donadio, L.H., Rocco, J.A., 1988. [Hyperestrogenism in swine due to natural poisoning with zearalenone]. *Rev Argent Microbiol* 20, 119-123.

Maaroufi, K., Chekir, L., Creppy, E.E., Ellouz, F., Bacha, H., 1996. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. *Toxicon* 34, 535-540.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R., Fink-Gremmels, J., 2006. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. *Vet J* 172, 96-102.

Mann, C.L., Davies, M.B., Boggild, M.D., Aldersea, J., Fryer, A.A., Jones, P.W., Ko Ko, C., Young, C., Strange, R.C., Hawkins, C.P., 2000. Glutathione S-transferase polymorphisms in MS: their relationship to disability. *Neurology* 54, 552-557.

Marasas, W.F.O., Nelson, P.E., Toussoun, T.A., 1984. *Toxigenic Fusarium species : identity and mycotoxicology*. Pennsylvania State University Press, University Park.

Mehmood, Z., Smith, A.G., Tucker, M.J., Chuzel, F., Carmichael, N.G., 2000. The development of methods for assessing the in vivo oestrogen-like effects of xenobiotics in CD-1 mice. *Food Chem Toxicol* 38, 493-501.

Minervini, F., Dell'Aquila, M.E., 2008. Zearalenone and reproductive function in farm animals. *Int J Mol Sci* 9, 2570-2584.

Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem* 247, 6960-6962.

Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95, 351-358.

Okubo, K., Nagahama, K., Kamoto, T., Okuno, H., Ogawa, O., Nishiyama, H., 2005. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms are associated with improvement in seminal findings after varicocelelectomy. *Fertil Steril* 83, 1579-1580.

Olsen, M., Pettersson, H., Kiessling, K.H., 1981. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 48, 157-161.

Othmen, Z.O., Golli, E.E., Abid-Essefi, S., Bacha, H., 2008. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, alpha Zearalenol and beta Zearalenol, on cultured Vero cells. *Toxicology* 252, 72-77.

Pestka, J.J., Tai, J.H., Witt, M.F., Dixon, D.E., Forsell, J.H., 1987. Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. *Food Chem Toxicol* 25, 297-304.

Rago, V., Siciliano, L., Aquila, S., Carpino, A., 2006. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. *Reprod Biol Endocrinol* 4, 36.

Salah-Abbes, J.B., Abbes, S., Abdel-Wahhab, M.A., Oueslati, R., 2009a. *Raphanus sativus* extract protects against ZEN-induced reproductive toxicity, oxidative stress and mutagenic alterations in male Balb/c mice. *Toxicol* 53, 525-533.

Salah-Abbes, J.B., Abbes, S., Haous, Z., Oueslati, R., 2009b. *Raphanus sativus* extract prevents and ameliorates zearalenone-induced peroxidative hepatic damage in Balb/c mice. *J Pharm Pharmacol* 61, 1545-1554.

Stabile, V., Russo, M., Chieffi, P., 2006. 17beta-estradiol induces Akt-1 through estrogen receptor-beta in the frog (*Rana esculenta*) male germ cells. *Reproduction* 132, 477-484.

Stadnik, A., Wójtowicz-Chomicz, K., Borzęcki, A., 2010. Influence of Zearalenone on Free Radical Reactions in Rat Liver Cells. *Bull Vet Inst Pulawy* 54, 611-615.

Swamy, H.V., Smith, T.K., Karrow, N.A., Boermans, H.J., 2004. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on

growth and immunological parameters of broiler chickens. *Poult Sci* 83, 533-543.

Szkudelska, K., Szkudelski, T., Nogowski, L., 2002. Daidzein, coumestrol and zearalenone affect lipogenesis and lipolysis in rat adipocytes. *Phytomedicine* 9, 338-345.

Tiemann, U., Danicke, S., 2007. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: a review. *Food Addit Contam* 24, 306-314.

Tomaszewski, J., Miturski, R., Semczuk, A., Kotarski, J., Jakowicki, J., 1998. [Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium]. *Ginekol Pol* 69, 363-366.

Turcotte, J.C., Hunt, P.J., Blaustein, J.D., 2005. Estrogenic effects of zearalenone on the expression of progesterin receptors and sexual behavior in female rats. *Horm Behav* 47, 178-184.

Tvrda, E., Knazicka, Z., Bardos, L., Massanyi, P., Lukac, N., 2011. Impact of oxidative stress on male fertility - a review. *Acta Vet Hung* 59, 465-484.

Vani, G.T., Mukesh, N., Prasad, B.S., Devi, P.R., Prasad, M.H., Rani, P.U., Pardhanandana, R. P. , 2010. Role of glutathione S-transferase Mu-1 (GSTM1) polymorphism in oligospermic infertile males *Andrologia* 42, 213–217.

Yang, J.Y., Wang, G.X., Liu, J.L., Fan, J.J., Cui, S., 2007. Toxic effects of zearalenone and its derivatives alpha-zearalenol on male reproductive system in mice. *Reprod Toxicol* 24, 381-387.

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

Zourgui, L., Golli, E.E., Bouaziz, C., Bacha, H., Hassen, W., 2008. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. *Food Chem Toxicol* 46, 1817-1824.

Figure 1

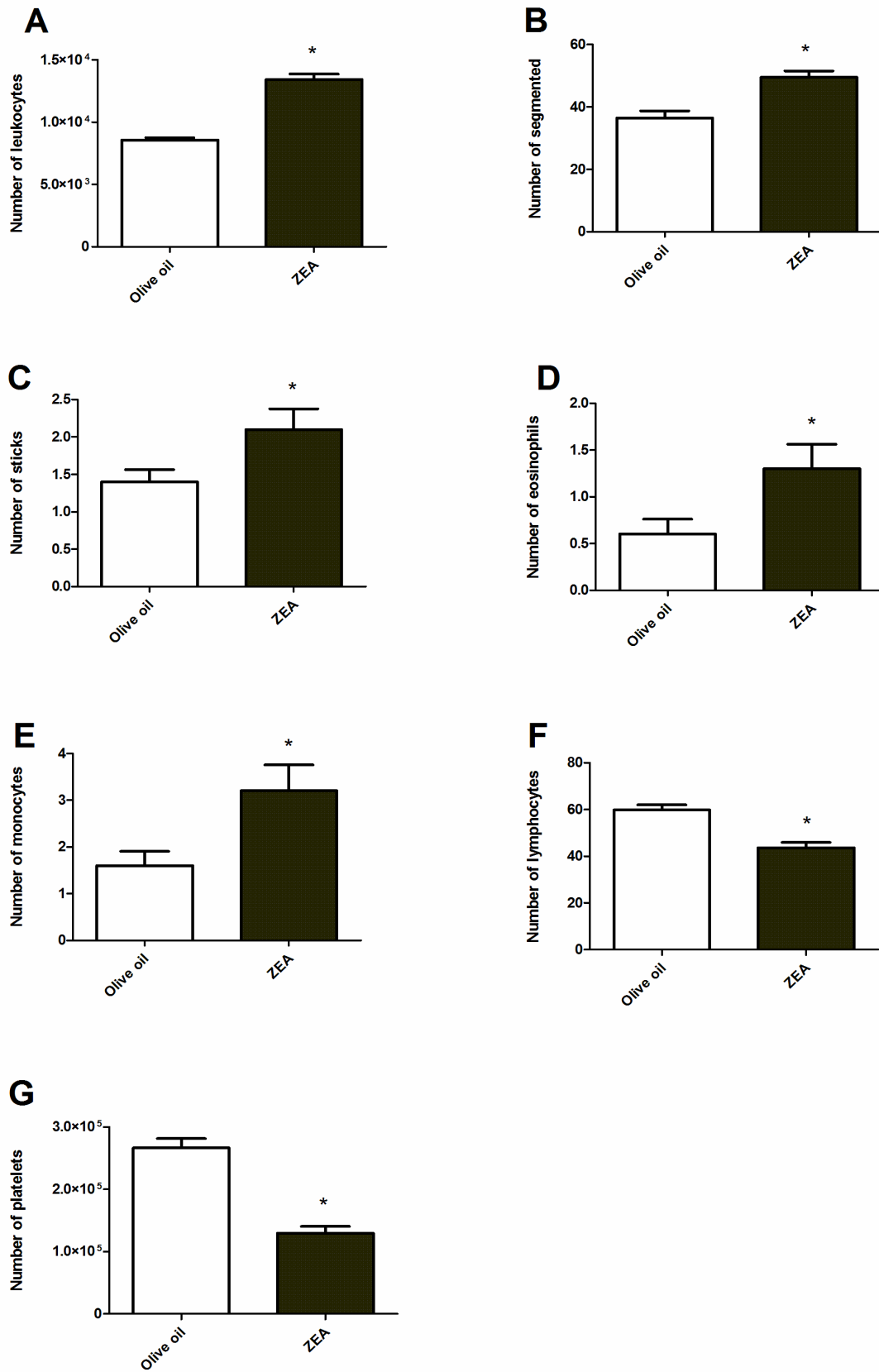


Figure 2

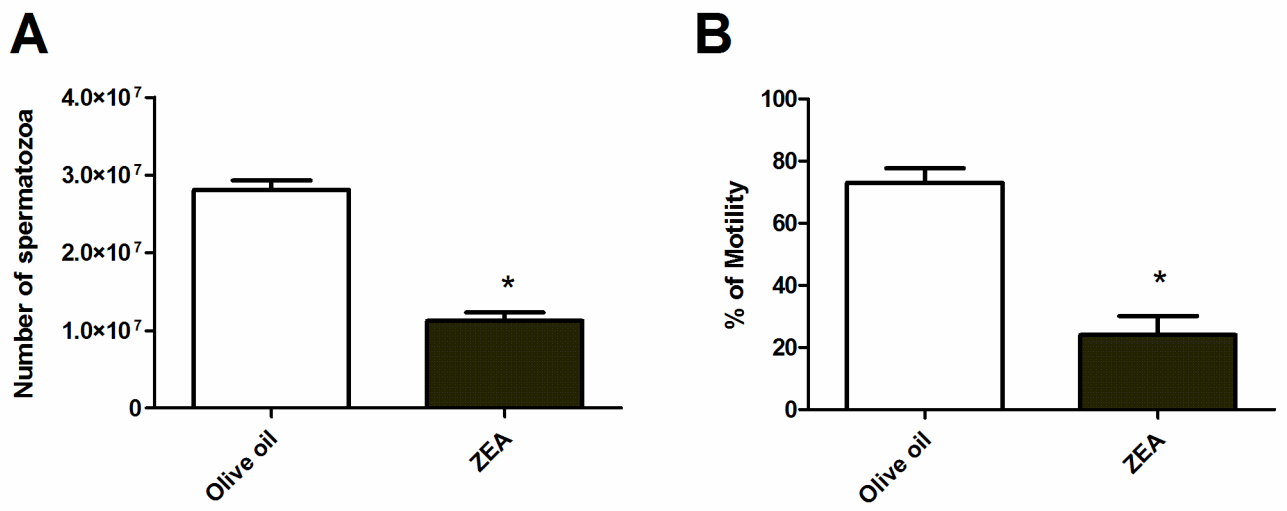


Figure 3

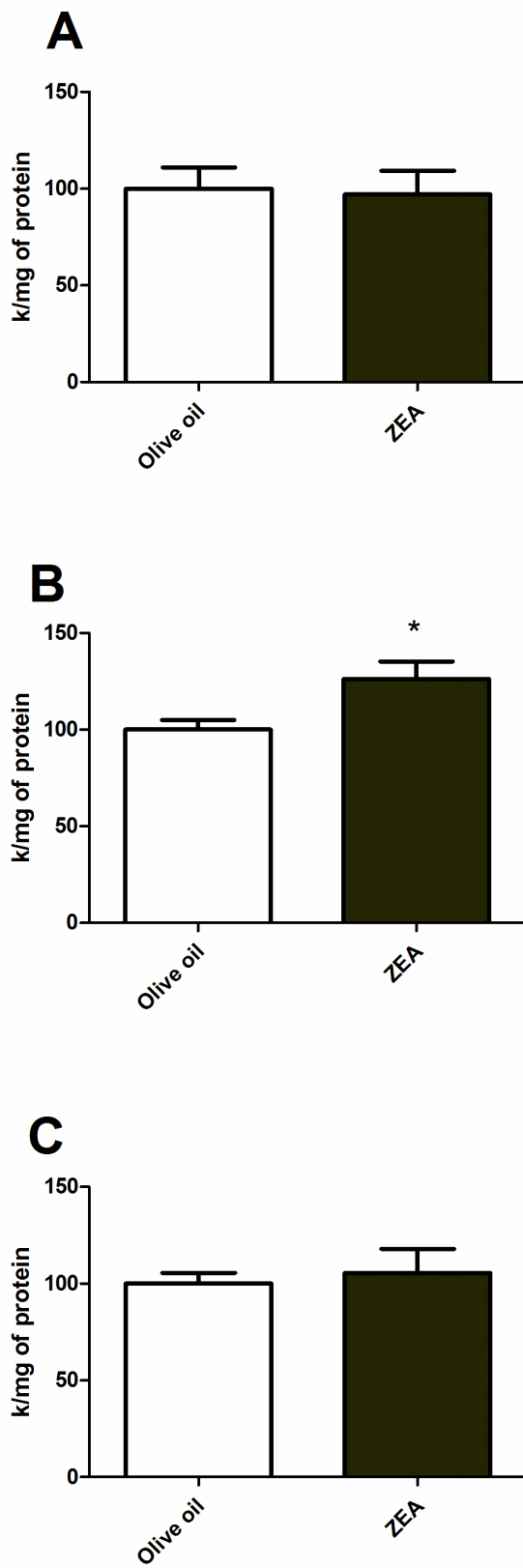


Figure 4

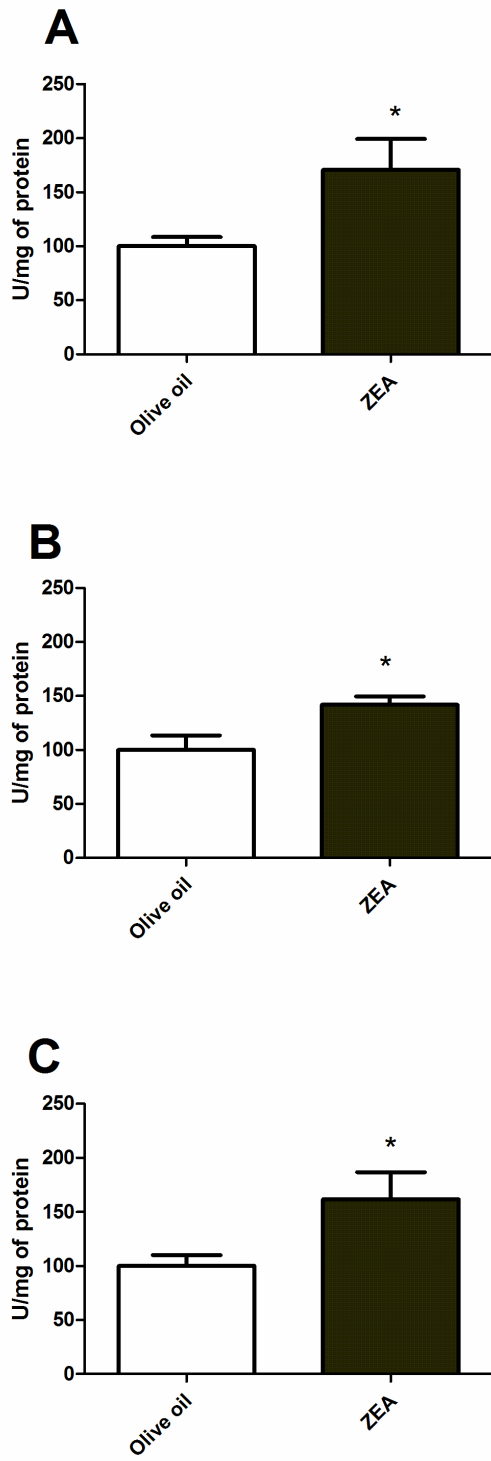


Figure 5

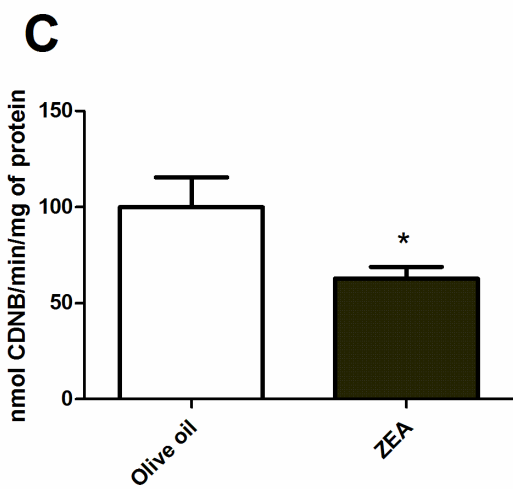
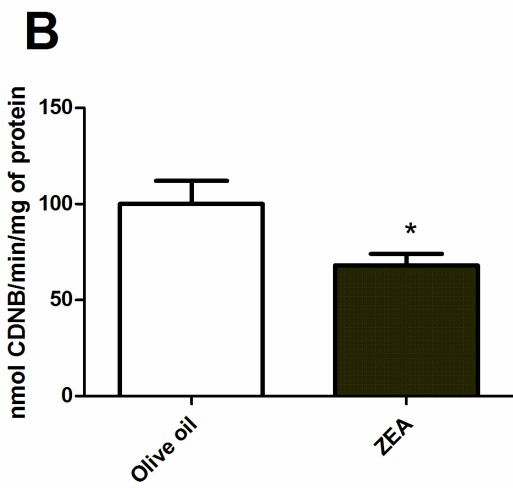
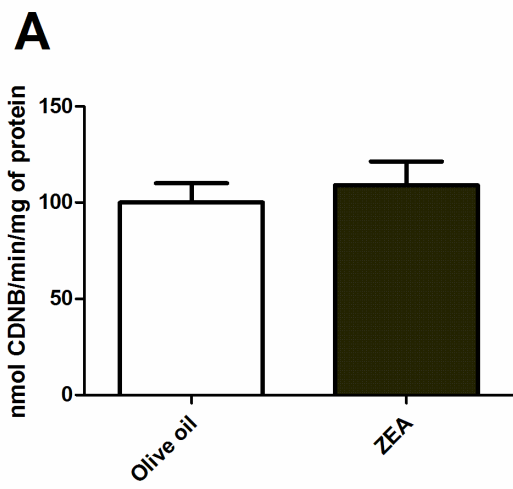


Table 1. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) on open-field parameters 48h after administration. Data are mean \pm S.E.M. for n= 10 animals in each group.

Treatment	Open-Field		
	Crossing	Rearing	Time of Cleaning (s)
Olive oil	140.8 \pm 12.13	60.60 \pm 6.94	64.80 \pm 10.71
ZEA	164.2 \pm 11.75	56.20 \pm 11.05	96.60 \pm 27.73

Table 2. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) 48 h after a single oral administration on organs relative weight. Data are mean \pm S.E.M. for n= 10 animals in each group. * Indicates a significant difference ($p<0.05$) compared with olive oil group.

Relative weight (g/%)		
Tissue	Olive oil	ZEA
Kidney	1.502 \pm 0.054	1.581 \pm 0.040
Liver	5.230 \pm 0.172	5.832* \pm 0.171
Lung	0.561 \pm 0.027	0.535 \pm 0.020
Spleen	0.137 \pm 0.004	0.128 \pm 0.006
Testes	0.619 \pm 0.040	0.602 \pm 0.049
Epidydimis	0.119 \pm 0.007	0.111 \pm 0.009

Table 3. Effect of ZEA (40 mg/kg, p.o.) 48h after administration on TBARS, NPSH and AA content in liver, kidney and testes 48h after administration. Data are expressed as percent of control, and represents the mean \pm S.E.M. for n= 10 animals in each group.

	TBARS		NPSH		AA	
	Olive Oil	ZEA	Olive Oil	ZEA	Olive Oil	ZEA
Liver	100.0 \pm 3.80	122.2 \pm 18.84	100.0 \pm 7.80	114.9 \pm 6.70	100.0 \pm 1.77	104.6 \pm 7.80
Kidney	100.0 \pm 7.50	99.55 \pm 4.65	100.0 \pm 11.18	124.7 \pm 15.17	100.0 \pm 2.18	120.4 \pm 14.77
Testes	100.0 \pm 7.19	109.6 \pm 11.24	100.0 \pm 8.46	109.7 \pm 4.52	100.0 \pm 3.77	106.1 \pm 5.19

PARTE III

DISCUSSÃO

A ZEA é uma micotoxina estrogênica não-esteroidal produzida principalmente por espécies de *Fusarium*, que crescem sobre os gêneros alimentícios, e apresentam alta incidência em vários países (Voigt et. al, 2007). A zearalenona é uma potente toxina, e representa uma ameaça para a saúde animal e humana, devido à isso se torna importante investigar os reais efeitos nocivos causados por esta micotoxina. Neste sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos agudos induzidos pela micotoxina, sobre o sistema hematológico, reprodutivo e parâmetros de estresse oxidativo em camundongos Swiss machos.

Com base nos nossos resultados, é possível perceber os efeitos deletérios da intoxicação aguda com a ZEA no sistema reprodutivo de camundongos Swiss machos através da significativa redução do número de espermatozoides bem como da motilidade espermática. O sistema hematológico também apresentou os efeitos nocivos induzidos pela ZEA através do aumento do número de leucócitos totais e suas frações (bastões, segmentados, eosinófilos e monócitos) e diminuição do número de linfócitos e plaquetas. A determinação de parâmetros enzimáticos e não-enzimáticos do estresse oxidativo também apresentou relação com a toxicidade induzida pela ZEA. A determinação dos tióis não-protéicos e do ácido ascórbico parecem não ter relação com os efeitos da micotoxina, assim como a peroxidação lipídica. Em contraste, houve aumento da atividade da SOD nos rins, fígado e testículos, aumento da atividade da CAT nos rins e diminuição da atividade da GST nos testículos e rins.

Existem poucos estudos correlacionando a intoxicação por micotoxinas e seus efeitos sobre a memória e o aprendizado (Takahide Kihara et al., 2000) e nenhum estudo relacionado com a análise comportamental após a administração de ZEA. Em nosso estudo a análise comportamental através do teste de campo aberto não resultou em diferenças significativas entre os

parâmetros analisados, sugerindo a realização de testes mais específicos para a análise dos efeitos agudos da ZEA no comportamento de roedores possa ser melhor estudado.

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do metabolismo dos organismos vivos e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell, (2000), antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo. Os mecanismos de defesa são formados por enzimas, tais como a SOD, a CAT, a GPx e GST. Além dessas defesas enzimáticas, existem ainda antioxidantes não-enzimáticos, como a vitamina E, a vitamina C, flavonóides e outras moléculas, como o β -caroteno (Palace et al., 1999; Ritter et al., 2004).

O dano oxidativo está entre as ameaças mais potentes e onipresentes enfrentadas por qualquer organismo vivo. O acúmulo intracelular de espécies reativas de oxigênio pode surgir de insultos tóxicos e pode perturbar o sistema de defesa antioxidante natural, resultando em danos a todas as principais classes de macromoléculas biológicas. Durante as últimas décadas, o estresse oxidativo têm sido apontado como principal responsável de vários processos biológicos e patológicos, como o envelhecimento, a inflamação, carcinogênese e várias outras doenças, incluindo Parkinson, Huntington, etc (Halliwell & Gutteridge, 1999). Neste sentido, torna-se importante estudar o efeito das micotoxinas, que estão presentes no dia-a dia da alimentação humana e animal, como sendo substâncias responsáveis por iniciar/agravar os efeitos nocivos do estresse oxidativo nos organismos vivos.

Desta forma, no nosso protocolo experimental observamos um aumento da atividade da CAT nos rins, e da SOD nos rins, fígado e testículos sugerindo um aumento compensatório na atividade destas enzimas antioxidantes na tentativa de evitar o dano oxidativo às células e macromoléculas (Abbe`s et al.

2006, 2007). Além disso, tal suposição pode ser apoiada pelo fato de que os níveis de defesas antioxidantes não-enzimáticas (NPSH e AA) e de um marcador de peroxidação lipídica (TBARS) não se alterou significativamente no rim, fígado ou testículos após administração aguda da micotoxina. Nesse contexto, pode-se sugerir que a ZEA tem maior capacidade em afetar os marcadores do sistema enzimático do que os marcadores do sistema não-enzimático do estresse oxidativo, e que o aumento de determinadas enzimas antioxidantes estaria relacionado com a neutralização do dano oxidativo bem como com o reparo da depleção das reservas de antioxidantes não-enzimáticos.

Em nosso trabalho, uma única dose da micotoxina foi administrada por via oral em camundongos Swiss machos, mostrando que uma exposição aguda é capaz de provocar alterações de modo diferente na atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GST. Resultados semelhantes foram observados por Stadnik, (2010), que mostrou aumento da atividade da SOD no fígado após 10 dias da administração de ZEA (200 e 500 mg/kg, p.o.), e nenhuma alteração no conteúdo de ácido ascórbico em fígado de ratos após 24 h ou 10 dias da administração de ZEA. Além disso, Zourgui et al., (2008) observaram aumento da atividade da catalase no fígado e rins de ratos 24 horas após a administração de ZEA (40 mg/kg, i.p.). Por outro lado, camundongos Balb/c machos tratados por 28 dias com ZEA (40 mg/kg, i.p.) apresentaram diminuição da atividade da glutathione peroxidase, SOD, CAT nos testículos (Salah-Abbes et al., 2009a). Da mesma maneira, Salah-Abbès et al., (2008) observaram redução da SOD em fígado e rins de camundongos Balb/c machos tratados por 10 dias com ZEA (40 mg/Kg, p.o.). Além das diferenças quanto às espécies animais, sexo e as doses de ZEA utilizadas, a metabolização hepática da micotoxina é um dos pontos de maior influência quanto à variação na atividade enzimática. Segundo Malekinejad et al., (2006), há diferenças quanto a biotransformação da zearalenona em animais como suínos, gado, galinhas e ratos.

Diante disso, a metabolização ou biotransformação da ZEA no organismo é dividida em duas fases: redução e conjugação (Gaumy et al., 2001). A redução ou hidroxilação é catalisada pelas enzimas 3α e 3β HSDs e

resulta na formação de α -ZOL e β -ZOL. Na fase posterior, a ZEA e seus metabólitos são conjugados com o ácido glicurônico através da enzima UDFGT. Logo, a biotransformação hepática da ZEA em α -zearalenol pode ser considerada uma etapa de ativação da toxina (Malekinejad et al., 2005). Assim, devido a maior atuação no tecido hepático com formação de metabólitos ativos, a biotransformação da ZEA pode estar relacionada à variação no peso do fígado de camundongos tratados com ZEA em relação ao controle, reforçando que mais estudos são necessários para elucidar os efeitos da intoxicação por micotoxinas em uma variedade de espécies e tecidos (Salah-Abbes et al., 2009a; Yang et al, 2007). Além disso, existem estudos correlacionando os efeitos estrogênicos e citotóxicos da ZEA com o aumento do peso, pela interação desta micotoxina com o metabolismo protéico. No ganho de peso a proteína é um dos componentes mais importantes quimicamente (de Lange et al., 2003). Nesses estudos, a não diferença entre o ganho de peso dos animais controle e, por consequência dos tecidos alvo, daqueles alimentados com ZEA demonstra a magnitude dos efeitos tóxicos desta micotoxina. Essa hipótese, no entanto, deve ser confirmada através de estudos mais aprofundados sobre metabolismo protéico em animais tratados com ZEA.

Estudos envolvendo o sistema reprodutivo mostram os efeitos deletérios da ZEA sobre o funcionamento deste sistema em camundongos machos. A ZEA atua bloqueando as ações fisiológicas dos ER α , devido a competitividade de ligação pelos mesmos sítios de ligação destes receptores (Kiang et al, 1978;. Katzenellenbogen et al., 1979). Além disso, a exposição à ZEA pode resultar em hiperestrogenismo e, conseqüentemente, levar à efeitos negativos sobre o sistema reprodutivo masculino. Camundongos machos expostos à ZEA apresentaram uma diminuição significativa no peso corporal, peso de testículos e no peso das vesículas seminais e da próstata. Além disso, a contagem de espermatozoides e os percentuais de motilidade espermática diminuíram nos animais expostos à ZEA (Salah-Abbes et al., 2008). Em nosso estudo, houve uma diminuição significativa na contagem de espermatozoides nos epidídimos, bem como uma redução da motilidade espermática. A realização da contagem de espermatozoides em homogeneizados de testículos ou epidídimos são indicadores importantes para a detecção dos efeitos adversos de várias

substâncias e/ou fatores sobre a espermatogênese (Ban et al., 1995). Kim et al. (2003) relatou que uma única dose de ZEA é capaz de induzir a apoptose de células germinativas testiculares em estágios específicos. Além disso, durante o desenvolvimento de espermatozóides, as espermatogônias e os espermátocitos foram as principais células-alvo na apoptose induzida pela ZEA. Neste sentido, além do dano celular induzido pela ZEA, outro mecanismo sugerido como sendo responsável pelos seus efeitos tóxicos é o estresse oxidativo.

Desta forma, a peroxidação lipídica (LPO) é uma das principais manifestações de dano oxidativo, e as enzimas antioxidantes representam os principais sistema de defesa contra a lesão dos testículos e carcinogênese. Salah-Abbes et al., (2009a) mostrou que aumentou significativamente a lipoperoxidação em testículos, enquanto que a atividade das enzimas antioxidantes GPx, SOD e CAT foram significativamente menores nos camundongos tratados com ZEA comparados com os do grupo controle. Meki et al., (2004) mostrou que o nível de LPO aumentou concomitantemente com a diminuição na atividade das enzimas antioxidantes. Em nosso estudo, os resultados da peroxidação lipídica (TBARS) e das enzimas antioxidantes SOD e CAT comportaram-se de modo diferente aos estudos anteriores, predizendo as variadas formas de ação da ZEA e sua relação com o estresse oxidativo. Além disso, cabe ressaltar que as diferenças quanto ao protocolo experimental (espécie, sexo, dose, via de administração, tempo de tratamento) também contribuem para explicar estas discrepâncias.

O fato do estresse oxidativo nos testículos ser um dos maiores fatores que induzem apoptose de células germinativas, este órgão tem concentrações relativamente altas de antioxidantes, como a glutathiona na forma reduzida (GSH), ácido ascórbico e vitamina E (Sanocka & Kurpisz, 2004). Estas substâncias protegem as células germinativas contra danos ao DNA e desempenham funções importantes na espermatogênese (Kasahara et al, 2002). Com base nos resultados de Hassen et al., (2007), a ZEA parece produzir muitos efeitos sobre o sistema oxidante como a diminuição significativa do nível de GSH. O sistema de glutathiona desempenha um papel crítico em diversos processos biológicos, incluindo a manutenção de grupos

sulfidrila em proteínas de membrana, a desintoxicação de drogas em reações envolvendo a glutathione-S-transferase, o reparo de moléculas danificadas e a detoxicação nos órgãos reprodutores masculino prejudicados por EROS (Fujii et al., 2003). A glutathione é importante na regulação do estado redox celular, e um declínio em seu nível celular tem sido considerado como indicativo do estresse oxidativo. Além disso, o sistema glutathione é possivelmente desequilibrado pela ZEA que resulta em uma diminuição na contagem de espermatozoides. Kaneko et al. (2002) relatou que as células espermatogênicas contêm níveis bastante elevados de glutathione redutase e, que a ZEA tem um efeito deletério sobre o sistema glutathione e sobre a regulação dos genes codificadores de isoformas de GST (Leffers et al., 2001). Nesse sentido, nosso estudo mostrou diminuição da atividade da enzima antioxidante GST nos testículos e rins. Este é o primeiro estudo que mostra uma diminuição da atividade da GST nos testículos após a administração da ZEA e o primeiro estudo que avalia esta enzima frente a ação da ZEA. Sugere-se que os mecanismos pelos quais a ZEA exerce seus efeitos em células germinais masculinas é provável, devido à sua capacidade de induzir o estresse oxidativo com produção de radicais livres e a depleção de algumas reservas antioxidantes específicas, como a enzima GST.

A glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas intracelulares divididas em cinco grupos principais com suas respectivas subunidades: Alpha (A1, A2, A3 e A4), Pi (P1), Mu (M1, M2, M3, M4 e M5), Theta (T1 e T2), e Zeta (Board et al., 1997; Lizard-Nacol et al., 1999). Essa família de enzimas, localizada no citosol celular, impede a ação de substâncias sobre as células, evitando danos ao seu DNA (Mannervik, 1985). Tais enzimas catalisam a conjugação de diversos compostos eletrofílicos à glutathione, promovendo a formação, na maioria das vezes, de metabólitos menos reativos e mais solúveis em água, o que faz com que sejam mais prontamente excretados pela urina (Zheng et al., 2002). Cerca de metade de todas as espécies animais possuem maior expressão das formas polimórficas dos genes codificadores das subunidades de GST, na qual estariam relacionadas à deleções ou mutações ocasionando alterações celulares, como o câncer (Rebbeck, 1999). De fato, polimorfismos dos genes GSTM1, GSTM3 e GSTM5 foram mostrados para

predispor à infertilidade masculina após a varicocele, por diminuição da motilidade e concentração de espermatozóides e causando dano oxidativo ao DNA de espermatozóides (Chen et al, 2002; Okubo et al, 2005). Sabe-se atualmente que o sistema GST também exerce papel importante no metabolismo dos estrogênios (Park et al., 2003). Diante disso, têm sido demonstrado que a GST tem um papel relevante de proteção durante a espermatogênese (Castellon, 1999) e que o gene Mu-1 (GSTM1) é uma isoenzima crítica na prevenção do estresse oxidativo em espermatozóides (Chen et al., 2002). Além disso, uma diminuição na contagem e motilidade de espermatozóides, além do aumento no número de espermatozóides mortos foi observado em seres humanos sem o gene GSTM1 (Vani, 2010), sugerindo um papel ainda mais crítico para a atividade de GST nos casos de infertilidade e oligozoospermia. Dados que comprovam os resultados obtidos em nosso estudo, no qual observamos uma redução da atividade da GST no testículo de camundongos tratados com ZEA, bem como uma redução no número e motilidade dos espermatozóides. Assim, a GST, como uma enzima detoxificadora e presente em grande quantidade no sêmen, desempenha um importante papel protetor contra o estresse oxidativo em espermatozóides (Mann et al., 2000).

Não obstante, a ZEA também apresenta efeitos imunotóxicos. Várias alterações dos parâmetros imunológicos foram associados com concentrações de ZEA em humanos (Berek et al., 2001), ratos (Marin et al., 1996) e em estudos *in vitro*, através da inibição da proliferação de linfócitos, aumento de IL-2 e IL-5, e indução de efeitos imunossupressores (Eriksen & Alexander, 1998; Murata et al., 2003). O tratamento com uma única dose intraperitoneal de ZEA (1.5, 3.0 e 5 mg/kg) induziu mudanças nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratos (Maaroufi et al., 1996). Apesar do efeito da ZEA sobre o sistema imunológico não ser totalmente compreendido, Forsell et al. (1986) e Pestka et al. (1987) mostram algumas evidências sobre os efeitos da ZEA no sistema imunológico em camundongos, na qual alterações hematológicas e em alguns parâmetros do sistema imune são observados em camundongos B6C3F1. Em nosso estudo, o aumento do número de leucócitos totais e frações, acompanhados da diminuição da contagem de linfócitos comprovou a

toxicidade imunológica aguda da ZEA em camundongos Swiss machos. Berek et al. (2001) afirmou que o efeito de imunossupressão induzido pela ZEA se dá através da depressão da atividade de linfócitos B e T. Estes resultados também foram apoiados por Swamy et al. (2004) que demonstraram que a ZEA, em dietas contaminadas, reduziu os níveis de células B em frangos de corte. A diminuição do número de plaquetas pode estar relacionada com alterações na coagulação sanguínea (Maaroufi et al.,1996). De fato, a ZEA é imunossupressora e capaz de promover alterações no tempo de protrombina dificultando o tempo de coagulação do sangue através da sua ação sobre determinados fatores de coagulação (Dilkin, 2003). De acordo com estes dados, em nosso estudo observou-se uma redução significativa do número de plaquetas após o tratamento com ZEA, predizendo assim, a ação tóxica da ZEA sobre o sistema de coagulação do sangue.

Diante do exposto, podemos concluir que o tratamento agudo de camundongos Swiss machos com a micotoxina zearalenona produziu alterações reprodutivas, hematológicas e em parâmetros relacionados ao sistema antioxidante. Os efeitos sobre o sistema oxidativo foram considerados de extrema relevância no entendimento do modo de ação toxigênico desta micotoxina, o qual parece atuar mais sobre o sistema antioxidante enzimático. Nesse sentido, a GST parece ser a enzima de maior importância, sendo o elo entre os danos espermáticos e o estresse oxidativo induzido pela ZEA.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- A intoxicação oral aguda induzida por ZEA aumentou o peso do fígado, sem alterar o peso do baço, pulmão, rins, testículo e epidídimos;
- A intoxicação oral aguda induzida por ZEA não alterou os parâmetros exploratórios e locomotores observados no teste do campo aberto;
- A intoxicação oral aguda induzida por ZEA aumentou o número de leucócitos totais, segmentados, bastões, eosinófilos, monócitos e reduziu o número de linfócitos e plaquetas;
- A intoxicação oral aguda induzida por ZEA diminuiu o número e a motilidade dos espermatozóides;
- A intoxicação oral aguda induzida por ZEA não alterou os parâmetros não-enzimáticos do estresse oxidativo avaliados, conteúdo de AA, NPSH e TBARS no fígado, rins e testículos;
- A intoxicação oral aguda induzida por ZEA causou um aumento na atividade da SOD nos rins, fígado e testículos, aumento da atividade da CAT nos rins e diminuição da atividade da GST nos testículos e rins.

REFERÊNCIAS

ABBES, S.; OUANES, Z.; SALAH-ABBES, J. B.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R.; BACHA, H. Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with Zearalenone. **Mutation Research**, v. 631, p. 85-92, 2007.

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

ABDEL-WAHHAB, M.A.; ABDEL-GALIL, M.M.; ELLITHEY, M.M. Melatonin counteracts oxidative stress in rats fed ochratoxin A-contaminated diet. **J. Pineal Research**, v. 38, p. 130–135, 2005a.

ABID-ESSEFI, S.; BOUAZIZ, C.; GOLLI-BENNOUR, E. E.; OUANES, Z.; BACHA, H. Comparative study of toxic effects of zearalenone and its two major metabolites alpha-zearalenol and beta-zearalenol on cultured human Caco-2 cells. **Journal of Biochemistry Molecular Toxicology**, v. 23, p. 233-243, 2009.

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

ABID-ESSEFI, S.; ZAIED, C.; BOUAZIZ, C.; SALEM, I. B.; KADERI, R.; BACHA, H. Protective effect of aqueous extract of *Allium sativum* against

zearalenone toxicity mediated by oxidative stress. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 2011.

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

BAN, Y.; KOMATSU, T.; KEMI, M.; INAGAKI, S.; NAKATSUKA, T.; MATSUMOTO, H. Testicular spermatid and epididymal sperm head counts as an indicator for reproductive toxicity in rats. **Experimental Animal**, v. 44, p. 315-322, 1995.

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

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

BETINA, V. Mycotoxins: production, isolation, separation, and purification. **Amsterdam: Elsevier**, p. 528, 984.

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

BOARD, P. G.; BAKER, R.G.; CHELVANAYAGAM, G.; JERMIN, L. S. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. **Biochemical Journal**, v. 328, p. 929-35, 1997.

BORUTOVA, R.; FAIX, S.; PLACHA, I.; GRESAKOVA, L.; COBANOVA, K.; LENG, L. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and

blood phagocytic activity in broilers. **Archives of Animal Nutrition.**, v.62, p. 303–312, 2008.

BOYD, P. A.; WITTLIFF, J. L. Mechanism of *Fusarium* mycotoxin action in mammary gland. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 4, p. 1–8, 1978.

BULLERMAN, L. B.; SCHOEREDER, L. L.; PARK, K. Y. **Journal Food Protection**, v. 47, p. 637-646, 1984.

BURGESS, L. W. General ecology of the Fusaria. In: Nelson PE, Tousson TA, Cook RJ (eds). ***Fusarium: disease, biology and taxonomy***. Pennsylvania, State University Press, 1981.

CAST. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. **Ed. Richard, L.; Payne, A.** (Task Force Report, No. 139), p. 199, 2003.

CASTELLON, E. A. Influence of age, hormones and germ cells on glutathione S-transferase activity in cultured Sertoli cells. **International Journal of Andrology**, v. 22, p, 49-55, 1999.

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

CAVRET, S.; LECOEUR, S. Fusariotoxin transfer in animal. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 444–453, 2006.

CELIUS, T.; HAUGEN, T.B.; GROTMOL, T.; WALTHER, B.T. Asensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. **Environmental Health Perspect.**, v. 107, p. 63–68, 1999.

CHEN, S. S.; CHANG, L. S.; CHEN, H. W.; WEI, Y. H. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. **Human Reproduction**, v. 17, p. 718-725, 2002.

CLAUS, R., HOANG-VU, C., ELLENDORFF, F., MEYER, H.D., SCHOPPER, D., WEILER, U. Seminal oestrogens in the boar: origin and functions in the sow. **Journal Steroid Biochemistry**, v. 27, p. 331-335, 1987.

COLE, R.J. & COX, R.M. In: **Handbook of Toxic Fungal Metabolites**. New York: Academic Press, p. 937, 1981.

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

D'MELLO, J.P.F.; PLACINTA, C.M.; MACDONALD, A.M.C. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, wealfare and productivity. **Animal feed science technology**, v. 80, p.183-205, 1999.

DE LANGE, C. F. M.; MOREL, P. H.; BIRKETT, S. H. Modeling chemical and physical body composition of the growing pig. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 14, p.E159-165, 2003.

DILKIN, P; *ET AL*. Toxicolological effects of chronic low doses of aflatoxin B1 and fumonisin B1-containing *Fusarium moniliforme* culture material in weaned piglets. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p. 1345-1353. 2003.

DING, X.; LICHTI, K.; STAUDINER, J. L. The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnene X receptor. **Toxicology Science**. v. 91, p. 448–55, 2006.

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

EDWARDS, S.; CANTLEY, T. C.; ROTTINGHAUS, G. E.; OSWEILER, G. D.; DAY, B. N. The effects of zearalenone on reproduction in swine: The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. **Theriogenology**, v. 28, n. 1, p. 43-49, 1987.

EFSA), F.S.A. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to zearalenone as undesirable substance in animal feed. www.efsa.eu.int , 2004.

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

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

ETIENNE, M.; DOURMAD, J. Y. Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: a review. **Livestock Production Science**, v. 44, p. 99–113, 1994.

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

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

FORSELL, J. H.; PESTKA, J. J. Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 1304–1307, 1985.

FORSELL, J. H.; WITT, M. F.; TAI, J. H.; JENSEN, R.; PESTKA, J. J. Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, p. 213-219, 1986.

FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. IN: ARORA, D.K., MUKERJII, K.G., MARTH, E.H. (ed). **Food and Feeds**. New York: Marcel Dekker, Handbook of applied mycology, v. 3, p. 31-68, 1992.

FUJII, J.; IUCHI, Y.; MATSUKI, S.; ISHII, T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. **Asian Journal of Andrology**, v. 5, p. 231–242, 2003.

GAUMY, J. L. et al. Zéaralénone: Propriétés et toxicité expérimentale. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 152, n. 3, p.219-234, 2001.

GONÇALEZ, E.; FELICIO, J. D.; PINTO, M. M.; ROSSI, M. H.; NOGUEIRA, J. H. C., MANGINELLI, S. Ocorrência de aflatoxina M1 em leite comercializado em alguns municípios do estado de São Paulo. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v. 72, n.4, p. 435-438, 2005.

GOPALAKRISHNAN, B.; SHAHA, C. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. **FEBS Letters**, v. 422, p. 296-300, 1998.

GREEN, M. L.; DIEKMAN, M. A.; MALAYER, J. R.; SCHEIDT, A. B.; LONG, G. G. Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent reproduction of gilts. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 171-178, 1990.

GROSSE, Y.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; HUC, A.; OBRECHT-PFLUMIO, S.; DIRHEIMER, G.; BACHA, H.; PFOHL- LESZKOWICZ, A. Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. **Cancer Letters**, v. 114, p. 225-229, 1997.

GUARRO, J. & GENÉ, J. Fusarium infections. Criteria for the identification of the responsible species. **Mycoses**, v.35, p.109-114, 1992.

HAGLER, W. M.; TOWERS JUNIOR, N. R.; MIROCHA, C. J.; EPPLEY, R. M.; BRYDEN, W. L. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen? In: Summerell, B. A.; Leslie, J. F.; Backhouse, D.; Bryden, W. L.; Burgess, L. W. (Ed.) **Fusarium**. St. Paul: APS Press, 321-331, 2001.

HALLIWELL, B. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, Oxford, 1999.

HALLIWELL, B.; The Antioxidant Paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-80, 2000.

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

HAUSCHILD, L.; LOVATTO, P.; LEHNEN, C.; CARVALHO, A.; GARCIA, G.; MALLMANN, C. Alimentação de suínos com dietas contendo zearalenona com adição de organoaluminossilicato: digestibilidade e metabolismo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 2006.

HOLLINGER, K.; EKPERIGIN, E. Mycotoxicosis in food producing animals. **Veterinary Clinics of North America**, v. 15, p.133–165, 1999.

HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENE J. & FIGUEIRAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. Central bureau Voor Schimmel cultures/ Universitat Rovira i Vigili, 2000.

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

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

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

KANEKO, J. J. Serum proteins and the dysproteinemias. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5th ed. San Diego: Academic Press, cap. 5, p. 117-138, 1997.

KASAHARA, E.; SATO, E.; MIYOSHI, M.; KONAKA, R.; HIRAMOTO, K.; SASAKI, J. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. **Biochemical Journal**, v. 365, p. 849 – 856, 2002.

KATZENELLENBOGEN, B. S.; KATZENELLENBOGEN, J. A., MORDECAI, D. Zearalenones: characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal β -resorcylic acid lactones. **Endocrinology**, v. 105, p. 33–40, 1979.

KIANG, D. T.; KENNEDY, B. J.; PATHRE, S. V.; MIROCHA, C.J. Binding characteristics of zearalenone analogs to estrogen receptors. **Cancer Research**, v. 38, p. 3611–3615, 1978.

KIM, I. H.; SON, H. Y.; CHO, S. W.; HA, C. S.; KANG, B. H. Zearalenone induces male germ cell apoptosis in rats. **Toxicology Letters**, v. 138, p. 185-192, 2003.

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

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

KUMMAR, V.; BASU, M.S.; RAJENDRAN, T.P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, p. 891–905, 2008.

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

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

LEFFERS, H.; NAESBY, M.; VENDELBO, B.; SKAKKEBAEK, N. E.; JORGENSEN, M. Oestrogenic potencies of zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. **Human Reproductive**, v. 16, p. 1037–1045, 2001.

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

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

LIZARD-NACOL, S.; COUDERT, B.; COLOSETTI, P.; RIEDINGER, J. M.; FARGEOT, P.; BRUNET-LECOMTE, P. Glutathione S-transferase M1 null genotype: lack of association with tumour characteristics and survival in advanced breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 1, p. 81-7, 1999.

MAAROUFI, K.; CHEKIR, L.; CREPPY, E. E.; ELLOUZ, F.; BACHA, H. Zearalenone induces modifications of haematological and biochemical parameters in rats. **Toxicol**, v. 34, p. 535-540, 1996.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R. F.; FINK-GREMMELS, J. Enzyme kinetics of zearalenone biotransformation: pH and cofactor effects. **Archives of Toxicology**, v. 79, p.547-553, 2005.

MALEKINEJAD, H.; MAAS-BAKKER, R.; FINK-GREMMELS, J. Species differences in the hepatic biotransformation of zearalenone. **The Veterinary Journal**, v. 172, p. 96–102, 2006.

MANN, C. L.; DAVIES, M. B.; BOGGILD, M. D.; ALLDERSEA, J.; FRYER, A. A.; JONES, P. W.; KO KO, C.; YOUNG, C.; STRANGE, R. C.; HAWKINS, C. P. Glutathione S-transferase polymorphisms in MS: their relationship to disability. **Neurology**, v. 54, p. 552-557, 2000.

MANNERVIK B. The isoenzymes of glutathione S-transferase. **Adv Enzymol.**, v. 57, p. 357-417, 1985.

MARIN, D. E. et al. Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune responses in weanling piglets exposed to low doses of aflatoxin. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1250-1257, 2002.

MARTINS, M. L. H.; MARTINS, M. Influence of water activity, temperature and incubation time on the simultaneous production of deoxynivalenol and zearalenone in corn (*Zea mays*) by *Fusarium graminearum*. **Food Chemistry**, v. 79, p.315–318, 2002.

MCGEE, D.C. Maize diseases: a reference source for seed technologists. **Saint Paul: The American Phytopathological Society, p150, 1998.**

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

MEKI, A. R.; ESMAIL, EL.-D.; HUSSEIN, A. A.; HASSANEIN, H. M. Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin. **Toxicol**, v. 43, p. 93–100, 2004.

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

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M.E.; MARITATO, F.; MINOIA, P.; VISCONTI, A. Toxic effects of the mycotoxin zearalenone and its derivatives on in vitro 40 maturation of bovine oocytes and 17 beta-estradiol levels in mural granulosa cell cultures. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p.489–495, 2001.

MINERVINI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Zearalenone and reproductive function in farm animals. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, p. 2570-2584, 2008.

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

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

MORENO, E. C.; GARCIA, G.T.; ONO, M. A.; VIZONI, E.; KAWAMURA, O.; HIROOKA, E.Y.; ONO, E. Y. S. Co-occurrence of mycotoxins in corn samples from the Northern region of Paraná State, Brazil. **Food Chemistry**, v.116, p.220–226, 2009.

MOSS, M. Mycotoxin Review –*Fusarium*. **Mycologist**, v. 16, p. 158-161, 2002.

MOSTROM M. Zearalenone. Edited by Ramesh C. Gupta (chapter 77). **Veterinary Toxicology**, p. 977- 982, 2007.

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

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* species. **Clinical Microbiology Reviews.**, v. 7, p. 479-504, 1994.

NOGOWSKI, L. Effect of the myco-oestrogen zearalenone on carbohydrate and lipid metabolism indices in ovariectomized female rats. Possible role of insulin and its receptor. **Journal of Animal Physiology Animal Nutrition**, v. 75, p.156-163, 1996.

OKUBO, K.; NAGAHAMA, K.; KAMOTO, T.; OKUNO, H.; OGAWA, O.; NISHIYAMA, H. GSTT1 and GSTM1 polymorphisms are associated with improvement in seminal findings after varicocelelectomy. **Fertility and Sterility**, v. 83, p. 1579-1580, 2005.

OLSEN, M.; PETTERSSON, H.; KIESSLING, K. H. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. **Acta Pharmacol Toxicol** (Copenh), v. 48, p. 157–161, 1981.

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

OTHMEN, Z. O.; GOLLI, E. E.; ABID-ESSEFI, S.; BACHA, H. Cytotoxicity effects induced by Zearalenone metabolites, alpha Zearalenol and beta Zearalenol, on cultured Vero cells. **Toxicology**, v. 252, p. 72-77, 2008.

PALACE, V. P., KHAPER, N., QIN, Q., SINGAL, P. K. Antioxidant potentials of vitamin a and carotenoids and their relevance to heart disease. **Free Radical Biology & Medicine** 1999; 26:746-761.

PARK, S. K.; KANG, D.; NOH, D. Y.; LEE, K. M.; KIM, U.; CHOI, J. Y.; AHN, S.H.; HIRVONEN, A.; STRICKLAND, P.; YOO, Y. Reproductive factors, glutathione S-transferase M1 and T1 genetic polymorphism and breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.78, p. 89-96, 2003.

PESTKA, J. J.; ABOUZIED, M. N.; SUTIKNO, T. Immunological assays for mycotoxin detection. **Food Technology**, v.2, p. 120–128, 1995.

PESTKA, J. J.; TAI, J. H.; WITT, M. F.; DIXON D.; FORSELL, J. H. Suppression of immune response in the B6C3F1 mouse after dietary exposure to the *Fusarium* mycotoxins deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, p. 297–304, 1987.

RAGO, V.; SICILIANO, L.; AQUILA, S.; CARPINO, A. Detection of estrogen receptors ER-alpha and ER-beta in human ejaculated immature spermatozoa with excess residual cytoplasm. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 36, 2006.

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

REBBECK, T. R. Molecular epidemiology of the human glutathione Stransferase genotypes *GSTM1* and *GSTT1* in cancer susceptibility. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 6, p.733– 43, 1997.

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

RITTER, C., ANDRADES, M. E., REINKE, A., BARRETO, S. M., MOREIRA, J. C. F., PIZZOL, F. D. Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis. **Critical Care Medicine** 2004; 32 (2):342-349.

SABINO, M. OGA, S. (ed.) **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora, p. 461- 472, 1996.

SALAH-ABBE` S, J.; ABBE` S, S.; HOUAS, Z.; ABDEL-WAHHAB, M. A.; OUESLATI, R. Zearalenone induces immunotoxicity in mice: possible protective effects of Radish extract (*Raphanus Sativus*). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1–10, 2008.

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

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

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

SANTURIO M. J. Micotoxicoses em Suínos. **PorkWorld**, Ano 1, p. 1 –22, 2003.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 1–7, 2004.

SANTIN, E. Mould growth and mycotoxin production. **The Mycotoxin Blue Book**. Nottingham, UK: Nottingham University Press, p. 225-234, 2005.

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

SMITH, J. E.; SOLOMONS, G.; LEWIS, C.; ANDERSON, J. G. Role of mycotoxins in human and animal nutrition and health. **Natural Toxins**, England, v. 3, p. 187- 192, 1995.

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

STADNIK, A.; WÓJTOWICZ-CHOMICZ, K.; BORZĘCKI, A. Influence of Zearalenone on Free Radical Reactions in Rat Liver Cells. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 54, p. 611-615, 2010.

STOB, M.; BALDWIN, R. S.; TUIITE J.; AMDREWS, F. N.; GILLETTE, K. G. Isolation of an anabolic, uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. **Nature**, v. 29: 1318, 1962.

SWAMY, H. V.; SMITH, T. K.; KARROW, N. A.; BOERMANS, H. J. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological parameters of broiler chickens. **Poult Science**, v. 83, p. 533-543, 2004.

SZKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T.; NOGOWSKI, L. Daidzein, coumestrol and zearalenone affect lipogenesis and lipolysis in rat adipocytes. **Phytomedicine**, v. 9, p. 338-345, 2002.

TAKAHIDE, K.; TAKUYA, M.; MICHIKO, S.; YOSHIKO, Y.; YOSHITAME, Y.; TAKASHI, T. Effects of Prenatal Aflatoxin B1 Exposure on Behaviors of Rat Offspring. **Toxicological Sciences**, v. 53, p. 392–399, 2000.

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

THE MERCK INDEX – An encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 14th.ed. Whitehouse Station, NJ, p. 1724-1725, 2006.

THOMAS, J. L. et al. Structure/function aspects of human 3[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, p. 73-82, 2004.

TIEMANN, U.; DANICKE, S. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive

organs in female pigs: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 24, p. 306-314, 2007.

TOWNER, R.; QIAN, S.; KADIISKA, M.; MASON, R. In vivo identification of aflatoxin-induced free radicals in rat bile. **Free Radical Biology & Medicine**, V. 35, p. 1330–1340, 2003.

UENO, Y.; AYAKI, S.; SATO, N.; ITO, T. Fate and mode of action of zearalenone. **Annales de la Nutrition et de Alimentation**, v. 31, p. 935–48, 1977.

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

VANI, G. T.; MUKESH, N.; PRASAD, B. S.; DEVI, P. R.; PRASAD, M. H.; RANI, P. U.; PARDHANANDANA, R. P. Role of glutathione S-transferase Mu-1 (GSTM1) polymorphism in oligospermic infertile males. **Andrologia**, v. 42, p. 213–217, 2010.

VEGA, J.; DIAZ, J.; SERRANO, E.; CARBONELL, F. Oxidative Stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome **Critical Care Medicine**, v. 30, p. 1782-1786, 2002.

VOIGT, C.A.; VON SCHEIDT, B.; GÁCSEK, A.; KASSNER, H.; LIEBEREI, R.; SCHÄFER, W.; SALOMON, S. Enhanced mycotoxin production of a lipase-deficient *Fusarium graminearum* mutant correlates to toxin-related gene expression. **European Journal of Plant Pathology**, v. 117, p. 1–12, 2007.

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

YEGANI, M., SMITH T.; LEESON S.; BOERMANS, H. Effects of feeding grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of broiler breeders. **Poultry Science**, v. 85, p.1541–1549, 2006.

ZHENG, W.; WEN, W.Q.; GUSTAFSON, D.R.; GROSS, M.; CERHAN, J.R.; FOLSOM, A.R. GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 74, p. 9-16, 2002.

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

ZOURGUI, L.; GOLLI, E. E.; BOUAZIZ, C.; BACHA, H.; HASSEN, W. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1817-1824, 2008.

PERSPECTIVAS

A fim de obter um melhor entendimento a respeito dos mecanismos de toxicidade e dos efeitos tóxicos provocados pela micotoxina Zearalenona este trabalho terá continuidade no doutorado. Nesta nova etapa serão analisados parâmetros que servirão de base para elucidar a toxicidade da ZEA e também para confirmar os resultados obtidos neste trabalho. Para isso objetiva-se realizar a análise histológica do tecido testicular, a dosagem do hormônio testosterona, a análise da toxicidade do metabólito ativo α - zearalenol (α -ZOL) e a pesquisa do antioxidante licopeno e sua possível ação na reversão da toxicidade causada pela ZEA através da sua capacidade antioxidante.

ANEXO I



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Caracterização dos efeitos tóxicos decorrentes da exposição aguda a micotoxinas em camundongos"

Numero do Parecer: 071/2011

Pesquisador Responsável: Ana Flavia Furian

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO:

Santa Maria, 07 de novembro de 2011.

Marta Lizandra do Rêgo Leal
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM