

**INFLUÊNCIA DAS VITAMINAS A, C e E NA IMUNOTOXIDEZ DE
MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS BALB-C EXPOSTOS A
AFLATOXINA B 1 E FUMONISINA B 1**

ALEXANDRE DE AGUIAR PEREIRA

**SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR
DR. RONALDO BASTOS FREIRE**

Tema submetido como requisito
parcial para obtenção do grau
de Mestre em Ciências em
Microbiologia Vegetal.

1999

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA VETERINÁRIA

INFLUÊNCIA DAS VITAMINAS A, C e E NA IMUNOTOXIDEZ DE
MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS BALB-C EXPOSTOS A
AFLATOXINA B 1 E FUMONISINA B 1

ALEXANDRE DE AGUIAR PEREIRA, 1972-

SOB A ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR
Dr RONALD BASTOS FREIRE, 1953-

Tese submetida como requisito
parcial para obtenção do grau
de Magister Scientiae em
Microbiologia Veterinária.

SEROPÉDICA, RIO DE JANEIRO
MARÇO, 1999.

626.0895904
P436i
T

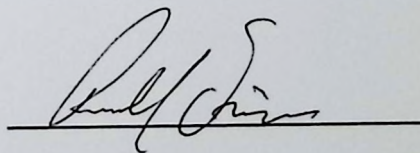
INFLUÊNCIA DAS VITAMINAS A, C e E NA IMUNOTOXIDEZ DE
MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS BALB-C EXPOSTOS A
AFLATOXINA B 1 E FUMONISINA B 1

AUTOR

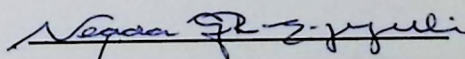
ALEXANDRE DE AGUIAR PEREIRA

TESE APRESENTADA EM 30/03/99.

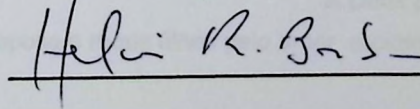
RONALD BASTOS FREIRE



NEDA GARCIA ROSA MIZUGUCHI



HÉLCIO RESENDE BORBA



AGRADECIMENTOS

Ao professor Ronald Bastos Freire, pela orientação, confiança e amizade.

As amigas Nilsona, Cristiane e Cinthia, pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao amigo Antônio Lúcio pela ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha esposa, que sempre está ao meu lado.

À Deus, o meu amigo e guia.

À CAPES pelo suporte financeiro.

À Deus pela
oportunidade, e a minha esposa e meus filhos pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ronald Bastos Freire, pela orientação, confiança e amizade.

Às amigas Miliane, Cristiane e Cinthia pela colaboração durante a realização deste trabalho.

Ao amigo Antônio Lúcio pela ajuda nos momentos mais atarefados.

À minha esposa, que sempre está ao meu lado.

À Deus, o meu muito obrigado.

À CAPES pelo suporte financeiro.

BIOGRAFIA

Alexandre de Aguiar Pereira, filho de Joel Pereira e Pedrina de Aguiar Pereira, nasceu em 16 de setembro de 1972, no município do Rio de Janeiro - RJ.

Ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no curso de Ciências Biológicas em 1992, graduando-se em licenciatura em outubro de 1996 e no Bacharelado em janeiro de 1997. Foi bolsista de iniciação científica do CNPq no período de 1993 a 1997, em um projeto de relação parasito - hospedeiro, avaliando a resposta dos hospedeiros intermediários frente a parasitos.

Em 1997, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária do Instituto de Veterinária.

RESUMO

No presente estudo, avaliou-se o efeito das micotoxinas (metabólitos tóxicos de fungos) aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB-C, isolados, associadas entre si e a diferentes vitaminas antioxidantes (A, C e E) nas dosagens terapêuticas indicadas seguidas de três diluições. Aflatoxina B1 e fumonisina B1 quando isoladas, ambas induziram a um índice significativo de degeneração nuclear que é uma marca da apoptose, mas quando associadas entre elas não induziram nenhum tipo de alteração morfológica. Estas micotoxinas quando associadas a vitaminas em diferentes doses de uma maneira geral não apresentaram efeitos tóxicos, possivelmente devido a atividades antioxidantes das vitaminas, entretanto mais estudos são necessários uma vez que pode ocorrer amplificação do efeito tóxico, como no caso da aflatoxina B1 e vitamina E mescladas.

SUMMARY

This study was performed to determine the effects of the mycotoxins aflatoxin B1 and fumonisin B1, singly or in combination, on BALB C mice peritoneal macrophages when exposed to the natural antioxidants vitamins A, C and E, in all possible combinations. The results indicated that single aflatoxin B1 or fumonisin B1 induced apoptosis in macrophages. Nevertheless, the association of these two mycotoxins did not induce any morphological changes in these cells. The vitamin E showed to be effective against fumonisin, however, the association of vitamin E and aflatoxin B1 caused enhanced cytotoxicity. The vitamins A and C offered effective protection against the cytotoxicity of both aflatoxin B1 and fumonisin B1.

SUMÁRIO

Resumo	Xii
Abstract	Xiii
1- Introdução	1
2- Revisão de literatura	4
3- Material e métodos	11
3.1- Animais	11
3.2- Preparo das micotoxinas	11
3.3- Vitaminas	12
3.4- Cultivo celular	12
3.5- Obtenção de macrófagos peritoneais	12
3.6- Técnica de exclusão de azul de Tripán	13
3.7- Teste de citotoxicidez	13
3.8- Soluções e meios	15
4- Análise estatística dos resultados.....	17
5- Resultados	18
5.1-Grupos controle	18
5.2- Efeito das micotoxinas sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB-C	25

5.2.1- Efeito da aflatoxina	25
5.2.2 Efeito da fumonisina.....	28
5.2.3 efeito da aflatoxina e fumonisina associadas	30
5.3- Efeito das micotoxinas associadas a vitaminas A, C e E sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB-C.....	32
5.3.1- Efeito de vitamina A	32
5.3.2- Efeito de vitamina C	32
5.3.3- Efeito de vitamina E	32
5.3.4- Efeito de vitaminas A, C e E associadas	33
6- Discussão.....	36
7- Conclusão	42
8- Referências Bibliográficas	43

1. INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários de baixo peso molecular produzidas por fungos que crescem em alimentos consumidos por animais e humanos. Quando ingerida, uma micotoxina pode causar diversos níveis de toxidez dependendo do tipo e da quantidade, dependendo da espécie e do sexo do animal e geralmente do estado nutricional. Os efeitos causados por uma ingestão de moderada a alta quantidades de micotoxinas podem ser caracterizados por mortalidade, baixo crescimento e redução da eficiência reprodutiva (PIER *et al*, 1980).

As micotoxinas podem influenciar profundamente a saúde da maioria das espécies animais e do homem, porém seus efeitos são mais evidentes em animais de produção, cuja a alimentação é baseada em rações concentradas (HERZOG-SOARES, 1994).

Os níveis de contaminação natural por micotoxinas, de um modo geral, não são altos o suficiente para causar micotoxicoses evidentes. Porém, atualmente tem sido reconhecido que a maioria dos pastos e alimentos contaminados causam síndromes de micotoxicoses crônicas ou determinam o aparecimento de doenças

secundárias, as quais manifestam-se em intensidades variáveis. Além disto, os animais podem demonstrar susceptibilidade variável às micotoxinas, dependendo de fatores genéticos, fisiológicos e ambientais (FREIRE & CRUZ, 1995).

Geralmente a micotoxicose é resultado não apenas da contaminação dos alimentos por uma única micotoxina, mas haverá outras situações ocorrendo simultaneamente, como deficiências nutricionais ou a presença de outras micotoxinas (FREIRE *et al*, 1996).

Atualmente já é reconhecido que as micotoxinas apresentam efeitos significativos a nível de sistema imune (PIER *et al*, 1980; SMITH & MOSS, 1985; CORRIER, 1991; COULOMBE, 1993).

Devido ao potencial que as micotoxinas apresentam em causar danos a saúde tanto humana como animal e que os níveis de contaminação natural por micotoxinas são normalmente baixos, o estudo relacionado a doses mínimas destes compostos e seus efeitos sobre o sistema imunitário são de extrema relevância. Apesar de a maioria dos estudos sugerirem que as micotoxinas possam afetar negativamente os mediadores liberados pelos macrófagos, assim como outras funções imunológicas importantes tais como, a produção de anticorpos, a liberação de complemento e a produção de interferon (SMITH & MOSS, 1985); e afetarem diretamente a capacidade fagocitária (HERZOG-SOARES, 1994) ainda são poucos os trabalhos relacionados com os efeitos imunossupressivos de misturas de micotoxinas, tal com ocorre no ambiente.

Recentemente tem se observado que o uso regular de alguns fatores na dieta alimentar apresentam um papel importante na toxicidez de micotoxinas e que as vitaminas A (retinol), C (ácido ascórbico) e E (tocoferol), com seus papéis de agentes antioxidantes, apresentam uma ação antitóxica dos efeitos produzidos pelas micotoxinas. Este trabalho visa esclarecer alguns aspectos da interação entre micotoxinas e vitaminas, procurando avaliar a ação de antioxidantes naturais para prevenção dos efeitos das micotoxinas em baixas concentrações sobre o sistema imunitário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A ocorrência natural de micotoxinas em baixas concentrações é extremamente comum em nosso País, que apresenta uma imensa diversidade climática e de cepas de fungos produtores de tais substâncias. O efeito da combinação entre micotoxinas parece ser sinérgico em alguns casos e aditivo em outros. A toxidez aditiva foi observada na maioria das combinações estudadas, como indicado por KUBENA *et al* (1994), mas em alguns casos, as interações resultaram em efeito sinérgico, como por exemplo, aflatoxina B1 e ochratoxina A, aflatoxina e toxina T2 e aflatoxina e diacetoxiscirpenol. A combinação entre ochratoxina A e deoxinivalenol gerou um efeito antagonista (KUBENA *et al*, 1995). A DL50 de micotoxinas, quando associadas diminui consideravelmente (TERSE *et al*, 1993). A exposição de células imunocompetentes a misturas contendo 10ng de citrinina adicionadas de 40ng de aflatoxina B1 provocou uma significativa diminuição na produção de anticorpos (MARTORELLI & FREIRE, 1996). Dependendo do sistema hospedeiro, pode haver uma amplificação entre 50 e 6600% da toxidez causada por micotoxinas, o que claramente sugere que estas são mais tóxicas em associações que isoladamente (TERSE *et al*, 1993).

Algumas micotoxinas têm a capacidade de se ligar a receptores celulares gerando sinais à célula, induzindo determinada atividade metabólica específica para aquele receptor. Estas mesmas substâncias podem ainda penetrar nas células e, dentro destas, interferir em algum processo metabólico específico (bloqueando sítios enzimáticos, competindo com compostos e moléculas no transporte de elétrons), perturbando assim, o equilíbrio metabólico. A citrinina por exemplo, quando no interior das células fagocíticas, funciona como um aceptor de elétrons, a qual interfere na cadeia respiratória e impede que a célula realize atividades de geração de energia para que ocorra a fagocitose (HERZOG-SOARES, 1994).

Os macrófagos desempenham um papel crucial tanto na resposta imune não específica quanto na resposta adquirida. Estas células realizam funções tanto de eliminação e destruição direta de microorganismos e células tumorais (BAUMANN & GAUDIE, 1994). Como células acessórias, os macrófagos processam antígenos e apresentam fragmentos imunogênicos aos linfócitos em associação com produtos de sua superfície das classes I e II do Complexo Maior de Histocompatibilidade (UNANUE, 1984). Quando os macrófagos apresentam expressão gênica de classe I, desencadeiam a resposta imune celular com seleção de sub-populações de linfócitos T, os quais proliferam na presença de interleucina 1 (IL1) secretadas pelos macrófagos. Os linfócitos T colaboradores secretam interleucina 2 (IL2) que estimulam os linfócitos B a diferenciarem-se e a secretar anticorpos, determinando a

ativação de novos macrófagos, os quais tomam-se especificamente armados contra o antígeno (FREIRE, 1988).

Após contato com determinantes imunogênicos, os macrófagos, produzem várias citocinas tais como, Fator Necrosante de Tumor (TNF) e interleucina 6 (IL6) que tem importante atividade biológica na estimulação de hepatócitos para secreção de proteínas relativas a fase aguda de síndromes infecciosas (BAUMANN & GAUDIE, 1994).

A diminuição da atividade fagocítica determinada pela exposição a micotoxinas pode estar associada a alterações de processos metabólicos, tais como: a glicólise que é essencial para a fagocitose, síntese molecular ou alterações nas membranas das células fagocitárias. A redução intracelular das micotoxinas se dá ao nível microsomal, mitocondrial e através da ação de enzimas solúveis, tais como a diaforase e a xantinodesidrogenase (CHAGAS, 1992). Sob condições aeróbias, a micotoxina é rapidamente oxidada produzindo ânion superóxido (O_2^-), que se converte em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A interação de H_2O_2 com o ânion superóxido pode levar a formação de ânion hidroxila (OH^-). O ânion OH^- é conhecido como uma das espécies reativas mais tóxicas, podendo causar alterações a nível de DNA e levar a formação de peróxidos de lipídeos (CHAGAS, 1992). Devido a sua grande afinidade eletrônica e também a proximidade de seus potenciais de redução estes compostos podem interferir na cadeia de transporte de elétrons, formando hidroxilaminas, capazes de comprometer o metabolismo celular.

A imunidade humoral, também pode ser suprimida através de dietas contendo pequenas concentrações de micotoxinas (CHU *et al* , 1988). Experimentos com camundongos demonstraram que fusarina C diminui a ativação e a função citotóxica de macrófagos ativados (DONG & ZHANG, 1986,1987) podendo inibir também a função do linfócito B e afetar a proliferação de linfócitos T (CHENG & ZHANG, 1987).

A fumonisina B1, uma das micotoxinas mais recentemente descobertas, tem sido associada com toxicidade e mortalidade em animais alimentados com grãos (COULOMBE, 1993); Esta micotoxina, causadora da leucoencefalomalacia eqüina, apresenta diversos efeitos tóxicos e carcinogênicos, provocando ainda modificações morfológicas importantes em macrófagos, tais como degeneração nuclear e perda de substância citoplasmática (CHU *et al*, 1988).

Os linfócitos quando em contato com micotoxinas, por exemplo a citrinina, também têm seu equilíbrio metabólico comprometido, interagindo com estas substâncias através da ligação com receptores de superfície, gerando um sinal interpretado pela célula como a programação de sua própria morte, a apoptose (SOUZA, 1996). A apoptose se caracteriza pela compactação e segregação da cromatina em massas circulares que se formam na superfície interna da membrana nuclear. O citoplasma se condensa, preservando a integridade das organelas e inicia-se a convolução da superfície nuclear. O núcleo se fragmenta e

posteriormente ocorre a condensação do citoplasma. A separação das protuberâncias da superfície nuclear formam os corpos apoptóticos de variados tamanhos e composição circundados por uma membrana, que são fagocitados (SCHWARTZ & OSBORNE, 1995).

O mecanismo de ligação entre as micotoxinas e os receptores de membrana dos linfócitos é dose-dependente, ou seja, a quantidade de moléculas disponíveis para interagir com o receptor celular e o tempo de exposição a estas moléculas, é que vão determinar o grau de comprometimento da célula (SOUZA, 1996).

De acordo com UENO *et al* (1995), a fumonisina B1 apresentou atividade citotóxica para células HL-60, mas não induziu a fragmentação do DNA em tais células.

As aflatoxinas tem demonstrado suprimir a imunidade mediada por células e a função celular efetora. A resposta celular é afetada quando utilizadas baixas doses de toxina, já em doses maiores tanto a produção de imunoglobulinas quanto a resposta por anticorpos diminui (CORRIER, 1991). A aflatoxina B1 reduz a habilidade de clarificação de substâncias antigênicas do sangue circulante (HERZOG-SOARES, 1994), reduzindo também o potencial fagocítico de macrófagos e polimorfonucleares. Esta, ainda quando associada com ochratoxina A, por exemplo, pode causar danos tanto ao nível de blastogênese linfocitária, como sobre os processos inflamatórios, podendo ainda, causar atrofia em órgãos linfóides, tais como a Bursa de Fabrícus e o Timo (CAMPBELL *et al*, 1983).

Segundo UENO *et al* (1995), a aflatoxina B1, a qual liga-se com o DNA seguindo-se de uma inibição da RNA- polimerase-DNA-dependente, apresentou uma alta fragmentação do DNA e também apresentou um efeito citotóxico significativo para células HL-60.

A exposição aguda de níveis de moderado a alto de toxina T2, um tricoteceno, afeta uma variedade de sistemas orgânicos e pode ser letal (CIRILLI, 1983; MUTOH *et al*, 1988). Em contraste, as exposições crônicas ou sub-crônicas a níveis baixos de toxina produzem uma significativa imunossupressão, caracterizada pela inibição da imunidade celular e humoral. Ainda, estudos recentes examinando a função do sistema imune alterado em animais expostos a toxina T2 tem demonstrado um decréscimo no número de linfócitos T e B circulantes, inibição da transformação de linfócitos, linfocitólise e diminuição de IgG e IgM (COORAY & JONSSON, 1990); a toxina T2 pode ainda afetar tanto a viabilidade quanto o potencial fagocítico de macrófagos (GERBERICK & SORENSON, 1983).

A toxina T2 foi demonstrada ser uma indutora de apoptose em linhagens de células HL-60, mas em contrapartida não apresentou uma citotoxidez significativa (UENO *et al*, 1995).

As micotoxinas podem associar-se a diferentes moléculas causando morte celular prematura. A associação de ochratoxina A com vitamina E ou vitamina C, pode gerar radicais livres, determinando assim a apoptose celular, com efeito deletério sinérgico quando esta micotoxina está associada a cafeína. Uma vez que

esta última inibe o reparo do ácido desoxiribonucleico (DNA), tal associação induz a mitose, a despeito das alterações fisiológicas, levando a síntese desordenada e ao esgotamento metabólico. Sendo assim, a ochratoxina A associada a cafeína, pode acarretar atividade genotóxica (STORMER, MYHRE & WIGER, 1996).

Sabe-se que os nutrientes da dieta apresentam um papel interativo na toxicidade de micotoxinas. Por exemplo, um aumento protéico, lipídico, de minerais traço ou de algumas vitaminas podem diminuir a toxicidade das aflatoxinas (DAVILA *et al*, 1983).

A imunossupressão e a redução da estimulação linfocitária induzidas por aflatoxina não foram alteradas pelo tratamento com vitamina E, embora esta vitamina tenha sido considerada um estimulante da imunidade humoral e celular, aumentando conseqüentemente a resistência a infecções (DAVILA *et al*, 1983).

Segundo MASOOD & RANJAN (1994) a vitamina C apresentou propriedades antitóxicas, prevenindo substancialmente a interferência da toxina T2 nos mecanismos anabólicos e catabólicos de suínos e BILGRAMI *et al* (1989) também demonstrou que uma dose regular de vitamina C pode minimizar os efeitos das micotoxinas sobre animais que são mantidos sobre confinamento.

Existem cerca de 300 micotoxinas com estrutura química definida. Dentre estas, somente dez têm sido estudadas em relação ao sistema imunitário animal (FREIRE, 1995,1996). Sendo assim, estudos relativos ao impacto destes contaminantes ambientais, associados a agentes antioxidantes naturais podem num futuro próximo, gerar conhecimentos passíveis de serem utilizados para o seu controle ou neutralização.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos da linhagem BALB-C oriundos do biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz e também camundongos BALB-C fornecidos pela Universidade Federal Fluminense .

3.2. Preparo das micotoxinas

As soluções estoque de aflatoxina B1 (AFB1) e fumonisina B1(FB1) foram diluídas, imediatamente antes do uso, na proporção de 1:100, em carbonato bicarbonato pH 9,0, obtendo-se desta forma uma solução estoque contendo aflatoxina B1 e fumonisina B1 na concentração de 100µg/ml. Estas soluções estoque foram diluídas até obtenção das concentrações desejadas: AFB1 (0,05µg/10⁶) e FB1 (0,025 µg/10⁶).

3.3. Vitaminas

Foram utilizadas vitaminas A, C e E de uso comercial obtidas em farmácia, nas concentrações terapêuticas diárias indicadas para uso humano: Vitamina A 2000UI/kg, Vitamina C 36UI/kg, vitamina E 100UI/kg, seguidas de três diluições consecutivas: 1/10; 1/20 e 1/50. A vitamina A foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,2%; a solução de vitamina E em DMSO 0,2% e acetona 0,025% e vitamina C em meio RPMI. Todas as vitaminas também foram preparadas imediatamente antes do uso, seguindo a metodologia descrita por YU *et al*, 1994.

3.4. Cultivo celular

Foi empregado como meio de cultura para macrófagos, meio completo Mit-Glutamin Ohne NaHCO_3 (RPMI 1640), adquirido de laboratório comercial especializado (SIGMA - St. Louis -USA) contendo 10% de soro fetal bovino(SFB), suplementado com 50U/ml de penicilina e 50µg/ml de estreptomicina.

3.5. Obtenção de macrófagos peritoneais

Utilizou-se a metodologia descrita por HERZOG-SOARES (1994). Os animais foram sacrificados e suas cavidades peritoneais lavadas com 5ml de solução citrato

de sódio a 0,3% e o exudato peritonial colocado em tubos siliconizados e gelados. Os tubos foram centrifugados à 400 x g a 10⁰ C durante 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em meio RPMI 1640. A concentração de células viáveis foi determinada pela técnica de exclusão de azul de Tripan , em câmara de Neubauer ao microscópio óptico binocular da marca Carl Zeiss Gena (400x).

3.6. Técnica de exclusão de azul de Tripan

Retirou-se 0,1 ml da suspensão de macrófagos e completou-se com 0,9 ml de solução salina a 0,1 ml de azul de tripan (diluído na proporção 1:10). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer, no retículo próprio para contagem de leucócitos. O número de células foi estimado com a seguinte fórmula:

$$N = cv \times dil \times 10^4$$

N = número de células não coradas

dil = diluição

3.7. Teste de Citotoxicidez

Para determinar os efeitos de aflatoxina B1 e fumonisina B1 sobre os macrófagos peritoneais, foi utilizada a metodologia descrita por HERZOG-SOARES (1994). As células foram mantidas em meio de cultivo em tubos de Leightomn com uma lamínula cortada acondicionada ao mesmo. Pipetou-se então 100µl da suspensão de células sobre a lamínula. Após uma hora, tempo necessário para que

os macrófagos se aderissem, foi adicionado 500µl de meio de cultivo, meio este que foi exposto a micotoxinas isoladas e associadas entre si de maneira a se obter as concentrações desejadas de AFB1(0,05µg/10⁶) e FB1 (0,025 µg/10⁶); adicionados de vitaminas isoladas e associadas e, incubadas à temperatura adequada de duas a seis horas com 90% de umidade e 5% de CO₂. Foram feitos grupos controles onde os macrófagos foram tratados apenas com vitaminas A, C e E isoladas e associadas de todas as formas possíveis e também grupos mantidos apenas em meio de cultivo, que foram submetidos as mesmas condições de temperatura e umidade. Após incubação, estas foram fixadas em metanol e colocadas para secar por dois minutos. As lamínulas foram coradas com o corante vital Giemsa durante 30 minutos e depois foram montadas em lâminas utilizando-se técnicas histológicas e avaliadas através da observação de seu perfil morfológico ao microscópio óptico binocular Carl Zeiss Gena (400x e 1000x).

3.8. Soluções e meios:

3.8.1. Solução Salina (0,65%) (pH7,2) :

Cloreto de sódio (NaCl) (MERCK)..... 0,65g
Água destilada 100ml
Autoclavada a 121 °C por 15 minutos e guardada a temperatura ambiente.

3.8.2. Solução de Bicarbonato de sódio (1M)

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3)³ 84,01g
Água destilada 1000ml

3.8.3. Tampão carbonato - bicarbonato (1M) (pH 9,0)

Solução de carbonato de sódio..... 100ml
Solução de Bicarbonato de sódio 800ml

3.8.4. Solução de Citrato de Sódio a 0,3%

Citrato de Sódio (REAGEN) 0,3g
PBS 100ml

3.8.5. Azul de Tripan a 0,1%

Azul de Tripan (REAGEN)	0,1ml
Água destilada	10 ml

3.8.6. Corante Giemsa

Giemsa (REAGEN)	10ml
Solução Salina (0,65%)	30ml

3.8.7. Meio Completo Mit-Glutamin Ohne NaHCO₃ (RPMI 1640)

Água destilada	
Soro fetal bovino	5%
Penicilina (SQUIBB)	50U/ml
Estreptomicina (SQUIBB)	50µg/ml.
Meio RPMI 1640 liofilizado (SEROMED)	10g/l
Filtrado em membrana Millipore, 0,22 µ.	

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo teste T de Tukey, com cálculo de diferença mínima significativa ($P < 0,05$), de acordo com a metodologia descrita por Vieira & Hoffman (1989).

No que diz respeito aos efeitos de fumonisina B1 e aflatoxina B1 isoladas, e aflatoxina B1 associada a vitamina E, os resultados sobre os índices de alterações apresentaram-se altamente significativos quando comparados com o controle. Tais resultados foram comparados com a literatura onde o índice considerado fisiológico de apoptose celular, o qual está em torno de 5%, acima deste valor já pode-se considerar o resultado como significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Grupos controle

Afim de avaliar se o efeito das micotoxinas isoladas, associadas entre si e associadas a vitaminas, foram devidos a alterações do meio, a características individuais das células ou se realmente ocorreram devido a atividade citotóxica da micotoxina administrada, foram criados sete grupos controle, com os quais foram estabelecidas as comparações morfológicas e quantitativas dos efeitos a nível de microscopia óptica de macrófagos submetidos aos diferentes tratamentos.

O primeiro grupo controle de células foi mantido apenas em meio RPMI (figura 1), o segundo grupo foi adicionado de vitamina A (figura 2), um terceiro foi mantido acrescentando-se vitamina C (figura 3) e um quarto com vitamina E (figura 4); o quinto, o sexto e o sétimo grupos (figura 5) foram feitos a partir das associações entre essas vitaminas. Todos estes grupos foram mantidos com o intuito de impor um maior índice de confiança nos resultados obtidos, avaliando-se possíveis alterações devidas aos diluentes utilizados para as vitaminas. Nenhum tipo de alteração, entretanto, foi observada com os grupos em questão, tendo sido por isso utilizado para meio de comparações o grupo com células em presença apenas de meio RPMI.

Os macrófagos dos grupos controle apresentaram morfologia celular característica, com células arredondadas e núcleo central (figura 1).

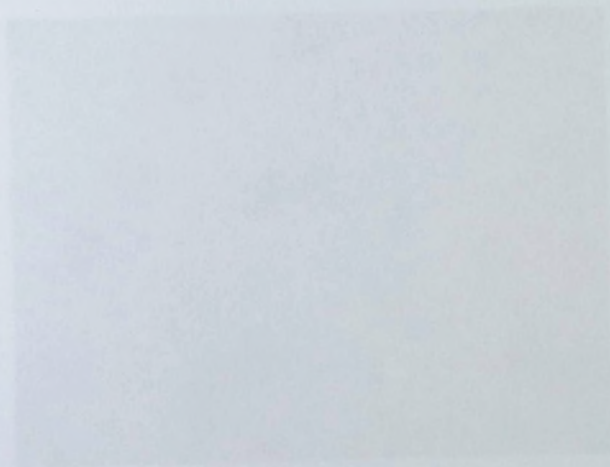


Figura 1 - Fotomicrografia de macrófagos pertencentes ao grupo controle - células arredondadas - núcleo central - RP42

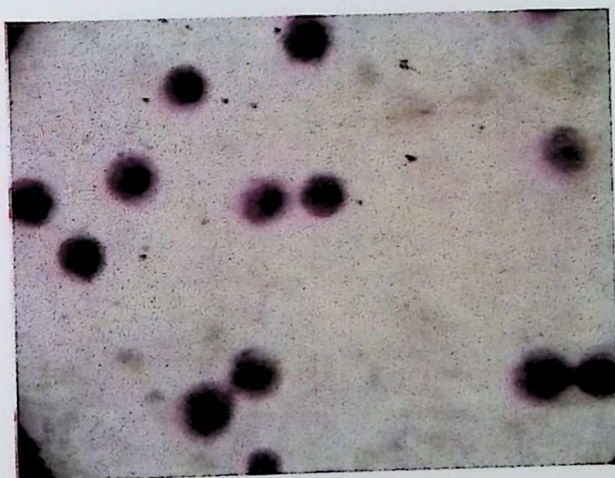


Figura 1 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos - controle - RPMI

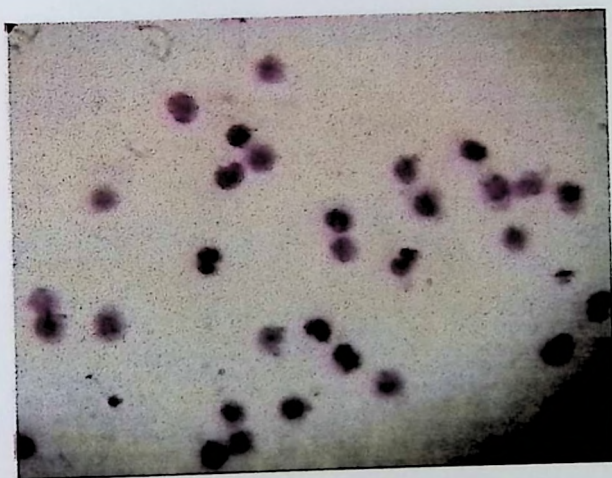


Figura 2 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com vitamina A



Figura 3 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com vitamina C

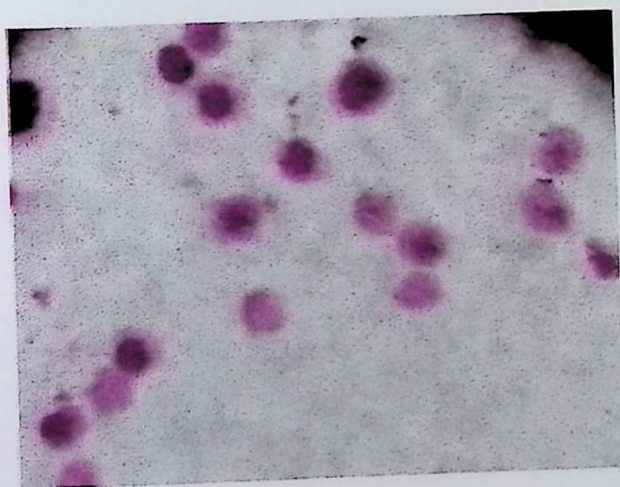


Figura 4 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com vitamina E

5.2. Efeito das micotoxinas sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB-C

5.1.2. Efeito da aflatoxina

A atividade citotóxica de aflatoxina B1 sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB-C, mantidos em meio de cultivo de células, com um intervalo de incubação de duas, quatro e seis horas, foi avaliada separadamente e comparada com o grupo controle.

Não houveram alterações aparentes nos macrófagos tratados com aflatoxina B1 após um intervalo de duas horas, quando comparados com o grupo controle. No entanto, observou-se que uma exposição de quatro horas induziu a uma degeneração nuclear em torno de 15% das células e que, após seis horas o percentual de degeneração foi de 20 % figura 6 (gráfico 1).

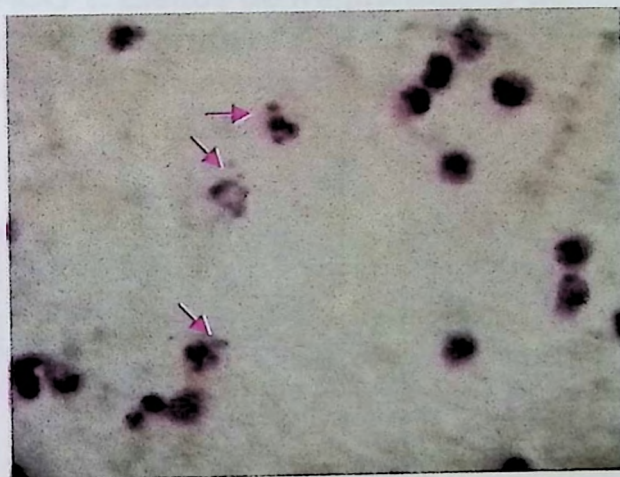
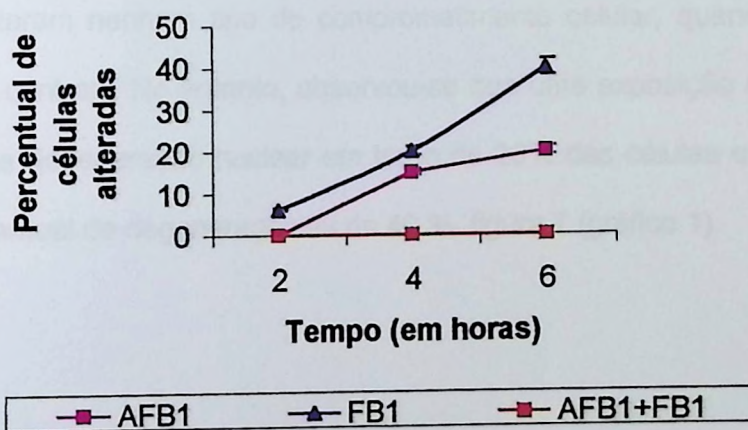


Figura 6 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com aflatoxina B1

GRÁFICO 1. Efeitos de fragmentação do material genético por AFB1 e FB1 sobre células peritoneais de camundongos BALB-C



AFB1 - Aflatoxina B1

FB1 - Fumonisina B1

5.1.2. Efeito da fumonisina

A atividade citotóxica da fumonisina B1 sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB-C, mantidos em meio de cultivo de células, com um intervalo de incubação de duas, quatro e seis horas, foi avaliada separadamente e comparada com o grupo controle.

Os macrófagos tratados com fumonisina B1, após um intervalo de duas horas, não apresentaram nenhum tipo de comprometimento celular, quando comparados com o grupo controle. No entanto, observou-se que uma exposição de quatro horas induziu a uma degeneração nuclear em torno de 20% das células e que, após seis horas o percentual de degeneração foi de 40 % figura 7 (gráfico 1).

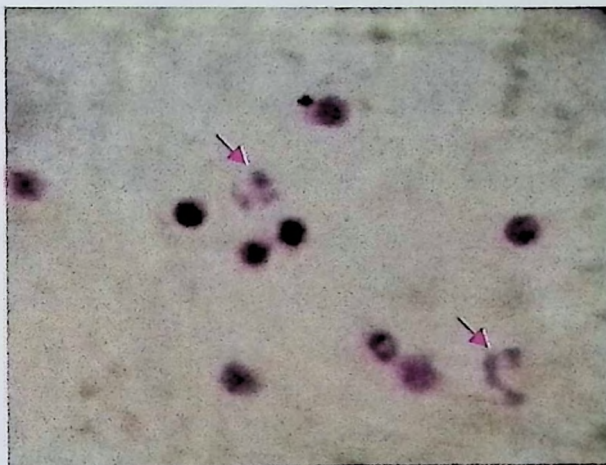


Figura 7 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com fumonisina B1.

5.1.3. Efeito da aflatoxina e fumonisina associadas

A associação de aflatoxina B1 e fumonisina B1, com os intervalos de incubação de duas, quatro e seis horas, não apresentou nenhum efeito citotóxico significativo quando comparadas com o grupo controle. Os macrófagos mantiveram seu aspecto característico com células arredondadas e núcleo central figura 8 (gráfico 1).



Figura 8 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com fumonisina B1 e aflatoxina B1.

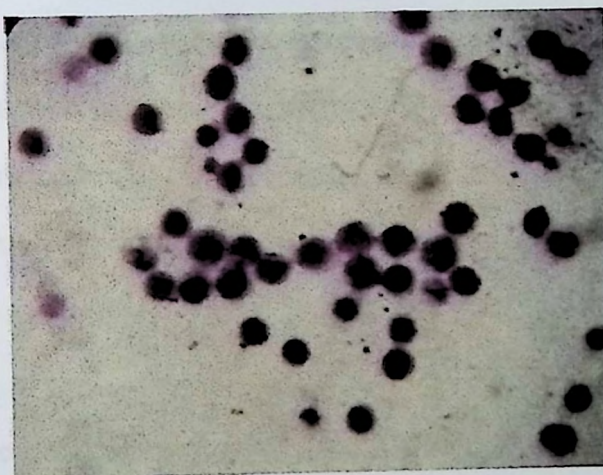


Figura 8 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com fumonisina B1 e aflatoxina B1.

5.2. Efeito das micotoxinas associadas a vitaminas A, C e E, sobre os macrófagos peritoneais de camundongos BALB-C

5.2.1. Efeito de vitamina A

Os macrófagos em cujo meio de cultura adicionou-se vitamina A na concentração terapêutica e seguida de diluições com micotoxinas isoladas (aflatoxina B1, fumonisina B1) e associadas, em intervalos de duas a seis horas, apresentaram características morfológicas normais em todo percentual de células analisadas.

5.2.2. Efeito de vitamina C

Os macrófagos tratados com aflatoxina B1 e fumonisina B1 e a associação destas duas micotoxinas, durante intervalos de duas, quatro e seis horas, não apresentaram alterações degenerativas, ou tóxicas, quando adicionadas de vitamina C na dose terapêutica e diluída.

5.2.3. Efeito de vitamina E

A exposição dos macrófagos a Aflatoxina B1 nos períodos de incubação de duas, quatro e seis horas, na presença de vitamina E, induziu a uma degeneração

nuclear com formação de corpos apoptóticos em todos os grupos, variando somente o percentual de degeneração em função do tempo de exposição. Nas células com duas horas de exposição, o percentual foi de 40%, nas células com quatro horas de exposição tal percentual atingiu 65% e após seis horas, a degeneração nuclear observada ficou em torno de 80% das células expostas (gráfico 2) em todas as diluições vitamínicas utilizadas.

As células expostas a Fumonisina B1 na presença de vitamina E durante o períodos de duas, quatro e seis horas não apresentaram alterações significativas em nenhuma diluição das vitaminas, quando comparadas com o sistema controle.

A associação entre aflatoxina B1 e fumonisina B1, quando em contato com vitamina E (diluições), também não apresentou um efeito citotóxico detectável nos macrófagos expostos.

5.2.4. Efeito das vitaminas A, C e E associadas

No que diz respeito a ação das micotoxinas sobre macrófagos peritoneais mantidos em meio de cultivo, tratadas com vitaminas mescladas (vitamina A e C, vitaminas A e E, vitaminas C e E ou todas as três juntas), nos intervalos de tempo de duas, quatro e seis horas, todos os grupos de células mantiveram suas características normais, semelhantes aos grupos controle, tanto os tratados com vitaminas quanto os que foram mantidos apenas em meio de cultivo.

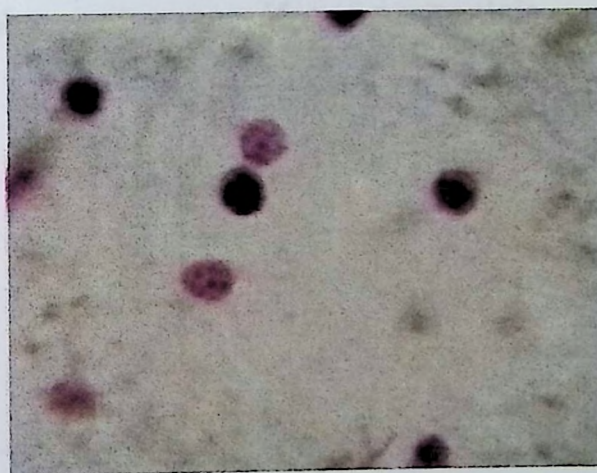
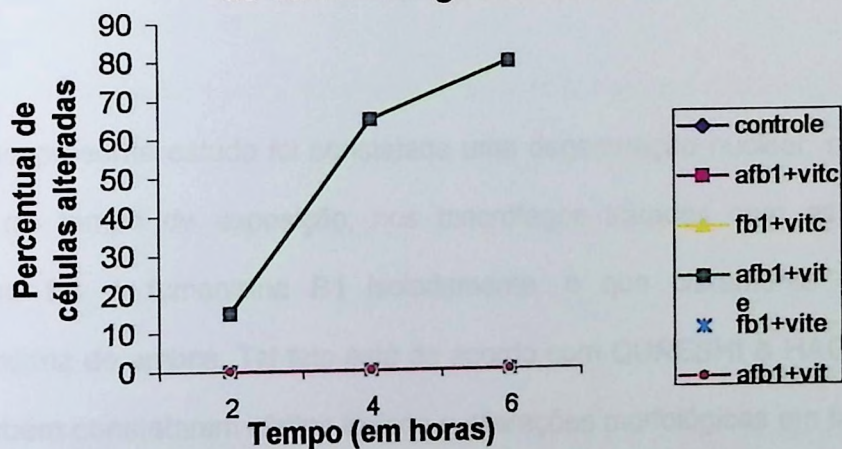


Figura 9 - Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos tratados com aflatoxina e vitamina E

GRÁFICO 2. Efeito da aflatoxina B1 e fumonisina B1 em associação com vitaminas sobre macrófagos peritoniais de camundongos BALB-C



Aflatoxina B1 - afb1
Fumonisina B1 - fb1
Vitamina A - vit a
Vitamina C - vit c
Vitamina E - vit e

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi constatada uma degeneração nuclear, crescente em função do tempo de exposição, nos macrófagos tratados com as micotoxinas aflatoxina B1 e fumonisina B1 isoladamente, o que claramente sugere uma imunotoxicidade de ambas. Tal fato está de acordo com QURESHI & HAGLER (1992), que também constataram efeitos tóxicos e alterações morfológicas em fagócitos, tais como desintegração nuclear e vacuolização citoplasmática, quando tratados com fumonisina B1.

A aflatoxina B1 é uma potente indutora de apoptose em determinadas linhagens de células, tais como HL-60, apresentando uma alta taxa de fragmentação do DNA (UENO *et al*, 1995). A alteração nuclear desencadeada pela aflatoxina B1 pode estar relacionada a formação do complexo AFB1-DNA, o qual pode levar à mutações e à ativação de genes supressores de tumor. Segundo YU *et al* (1995), o

complexo AFB1-DNA é a ligação covalente da aflatoxina B1 ao DNA celular, o primeiro sinal da hepatocarcinogênese, consequência da aflatoxicose.

KUBENA *et al* (1995) observou uma inibição na síntese do colesterol e a redução de triglicerídeos no soro, ocasionados pela deficiência no transporte lipídico em células tratadas com aflatoxina B1. De acordo com SMITH & MOSS (1985) a aflatoxina interfere no metabolismo dos ácidos graxos. Os ácidos graxos são precursores de leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos, importantes mediadores da resposta inflamatória, o que poderia ser uma outra possível via de atuação negativa desta micotoxina.

De acordo com o presente trabalho, as exposições dos macrófagos peritoneais à fumonisina B1 induziram a um aumento progressivo da degeneração nuclear e citoplasmática. A fumonisina B1 apresenta vários efeitos tóxicos levando a alterações morfológicas significativas em fagócitos de aves tais como desorganização citoplasmática e desintegração nuclear (QURESHI & HAGLER, 1992) o que sugere a apoptose. O mecanismo de atuação desta micotoxina no processo de apoptose não está totalmente esclarecido, porém parece ser distinto daquele que ocorre com a aflatoxina B1, pois de acordo com COULOMBE (1993), a ação carcinogênica de fumonisina B1 não parece envolver interação com DNA. O efeito citotóxico desta toxina pode então estar relacionada a um mensageiro intracelular: a ceramida.

A fumonisina inibe a atividade da enzima chave na biossíntese dos esfingolipídeos, a ceramida sintetase (SHARMA, 1997). A ceramida é sintetizada a partir da esfingomielina, um fosfolípido presente nas membranas e segundo PUSHKAREVA (1995) é um regulador endógeno da apoptose. A citotoxidez da

ceramida se expressa através do mimetismo dos efeitos tóxicos do Fator Necrosante de Tumor (TNF), a qual é uma citocina produzida pelos macrófagos e que induz apoptose em células tumorais. QURESHI & HAGLER (1992), por exemplo, demonstrou que após a exposição de macrófagos à fumonisina B1, ocorreu a produção endógena de uma molécula semelhante ao TNF, o que reforça a hipótese de mimetismo desta citocina pela fumonisina B1.

No presente trabalho, os macrófagos expostos a aflatoxina B1 e a fumonisina B1, no período de incubação de duas horas, não revelaram alterações citotóxicas. Este fato pode ter sido resultado do pouco tempo requerido pela célula para exibir o processo de apoptose.

No presente estudo, os macrófagos tratados com as micotoxinas aflatoxina B1 e fumonisina B1, isoladas ou associadas, adicionadas das vitaminas A ou C, não apresentaram alterações degenerativas ou tóxicas. A inibição dos efeitos tóxicos das micotoxinas em condições experimentais, em associação com as vitaminas, pode estar relacionada à capacidade antioxidante dessas moléculas.

As vitaminas A, C e E, utilizadas no presente estudo estão relatadas entre os mais eficientes antioxidantes naturais conhecidos e apresentam a capacidade preventiva no desenvolvimento de diversos tipos de câncer (YU *et al*, 1994).

O mecanismo de interferência das vitaminas na atividade imunotóxica da aflatoxina B1 e da fumonisina B1 não está ainda esclarecido. Tal fato pode ser atribuído a detoxicação ou neutralização das micotoxinas ou decorrente de um mecanismo semelhante ao da camitina, uma substância que, quando em presença

de vitamina C, aumenta o tempo de vida das células retardando a fragmentação do DNA e a condensação nuclear, que são marcas da apoptose .

YU *et al* (1994) sugeriram que a inibição da modificação do DNA pela Aflatoxina B1, não estaria relacionada a atividade antioxidante das vitaminas A, C e E , uma vez que em seu estudo, a vitamina C demonstrou atividade inibitória na ligação da aflatoxina B1 com o DNA, e a vitamina E, ao contrário, demonstrou aumentar a formação do complexo AFB1-DNA.

A vitamina A inibe o metabolismo do citocromo P-450 que, ligado ao superóxido, é um intermediário na ativação do oxigênio nas reações de hidroxilação, gerando metabólitos reativos que interferem no reparo do DNA (HARPER, 1990).

Os macrófagos tratados com aflatoxina B1 adicionada de vitamina E foi a única associação onde notou-se um aumento do efeito citotóxico das micotoxinas aqui relatadas. Tal amplificação do efeito da aflatoxina B1 associada a vitamina E também foi relatado por YU *et al* (1994) e por HARVEY (1994), que demonstrou que ainda não houve efeito protetor da vitamina E na dieta de porcos expostos a esta micotoxina.

Devido a similaridade entre os sinais da deficiência de vitamina E e a aflatoxicose, SPEER (1971) propôs que aflatoxina B1 poderia exercer seu efeito através da interferência no metabolismo da vitamina E.

A vitamina E parece estar na primeira linha de defesa contra a peroxidação dos fosfolipídeos da membrana celular. A peroxidação dos lipídeos é uma reação em cadeia que fornece um suprimento contínuo de radicais livres (HARVEY, 1994) e pode ser induzida pela aflatoxina B1. A hipótese de interferência da aflatoxina B1 na

atuação da vitamina E deve ser considerada, pois a nulidade da atuação de tal vitamina poderia aumentar a incidência de radicais livres.

No presente estudo, os macrófagos tratados com as micotoxinas aflatoxina B1 e fumonisina B1 associadas, adicionadas ou não das vitaminas A, E, C e suas possíveis combinações, não apresentaram efeitos imunotóxicos aparentes. As células tratadas apresentavam-se morfológicamente similares às células do grupo controle. Tal efeito é o oposto do que foi obtido por KUBENA *et al* (1995), os quais relataram que a combinação destas duas toxinas produziu resultados mais rígidos que aqueles induzidos por estas micotoxinas individualmente. Tal discordância entretanto, pode ter se devido ao fato desses autores terem trabalhado com uma dose muito maior de micotoxinas do que aquela utilizada no presente estudo. Isto sugere que o mecanismo de ação e de interação das micotoxinas possa ser dose-dependente, o que estaria de acordo com as observações feitas por SMITH & MOSS (1985), os quais relataram que uma pequena concentração de aflatoxina B1, incapaz de afetar a taxa de crescimento, é suficiente para alterar o metabolismo lipídico.

O efeito nulo da aflatoxina B1 e fumonisina B1 associadas entre si observado no presente trabalho, sugere que estas micotoxinas quando juntas, em baixas concentrações, não causam efeitos tóxicos aditivos, ao contrário, parece ocorrer uma competição por sítios metabólicos semelhantes ou a formação de um possível complexo estável entre essas duas substâncias.

As concentrações de micotoxinas encontradas naturalmente no ambiente podem oferecer diversos riscos ao homem, seja por uma contaminação direta, alimentando-se de grãos contaminados ou indireta, através do consumo de animais

de corte. Os níveis de toxinas considerados aceitáveis podem ocasionar danos imediatos indetectáveis, podem porém levar a síndromes crônicas, devido a seu efeito imunossupressor.

As precárias condições de armazenamento e estocagem em nosso País associadas à má alimentação e a uma dieta irregular de vitaminas pela população, constituem um agravante que podem representar um risco em potencial. Assim sendo, por sua importância econômica e em medicina humana e veterinária torna-se imprescindível a continuação desta linha de pesquisa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

A administração de subdoses de micotoxinas pode gerar efeitos imunossupressivos, os quais podem ser contrabalanceados por antioxidantes tais como as vitaminas A e C.

Os antioxidantes naturais apresentam uma importante forma de neutralização dos efeitos tóxicos produzidos por micotoxinas: aflatoxina B 1 e fumonisina B1 .

As micotoxinas mesmo em doses muito baixas são um risco em potencial para a saúde do homem e dos animais que não estejam nutricionalmente equilibrado. Neste caso, baixas doses de micotoxinas sobre a imunidade animal oferece risco potencial principalmente para neonatos de espécies criadas sob regime de confinamento, como aves e suínos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAUMANN, H & GAUDIE, J. The acute phase response. *Immunology Today*, 15:74-80. 1994.
- BILGRAMI, K. S., S. P. SINHAS & K. S. RANJAN. Modulation of protective effects of vitamin C in aflatoxicosis. *Current Science*, 58: 820-821. 1989.
- CAMPBELL, M. L. J., J. D. MAY, W. E. HUFF & J. A. DOERR. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Science*, 62(11):2138-2144. 1983.
- CHANG, C. F; P. B. HAMILTON. Impairment of Phagocytosis by Heterophils from Chickens during Aflatoxicosis. *Toxicological Applied Pharmacology*, 48:459-466. 1979.
- CHAGAS, G. M. *Efeitos da citrinina sobre mitocôndrias de fígado e córtex renal de ratos e células BHK-21*. Tese de Doutorado em Ciências, Universidade Federal do Paraná, 148 p. 1992.
- CHENG, L. & ZHANG, Y. Suppression of the *in vitro* lymphoproliferative to syngeneic L1578 tumor cells by fusarin C in mice. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 6:25-29. 1987.

- CHU, Q. L., M. E. COOK, W. WU & E. B. SMALLEY. Immune and bone properties of chicks consuming corn contaminated with a *Fusarium* that induces dyscondroplasia. *Avian Disease*, 32: 131-136. 1988.
- CIRILLI, G. Trichothecene problems in Italy: Chemical, biological and toxicological aspects. *Natural toxins*, 11: 254-258. 1983.
- COORAY, R. & P. JONSSON. Modulation of resistance to mastitis pathogens by pretreatment of mice with T-2 toxin. *Food chemical toxicological*, 28: 687-692. 1990.
- CORRIER, D. E. Micotoxycosis: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 30:73-87. 1991.
- COULOMBE, R. A. Symposium: Biological action of mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76: 880-891. 1993.
- DAVILA, J. C, G. T. EDDS & O. OSUNA. Modification of the effects of aflatoxin B1 and warfarin in young pigs given Selenium. *American Journal of Veterinary Research*, 44: 1877-1883. 1983.
- DONG, Z. & Y. ZHANG. Modulation of macrophage-mediated cytotoxicity activity: Inhibitory effect of a mycotoxin fusarin C on macrophage activation in mice. *Chinese Journal of Immunology*, 2:321-325. 1986.
- DONG, Z. & Y. ZHANG. Inhibitory effect of a mycotoxin fusarin C on macrophage activation and macrophage mediated cytotoxicity to tumor cells in mice. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 6:31-38. 1987.
- FREIRE, R. B. A resposta imune dos animais domésticos: diagnóstico e controle. *Coleção da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, 1: 154. 1988.

- FREIRE, R. B. Micotoxinas e imunossupressão em aves. *I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves*. P.115-125, 16-21 set., Curitiba - PR, 1995.
- FREIRE, R. B. Possibilidades e limites do diagnóstico imunológico das micotoxinas. Cap. 10, p. 78-90; micotoxinas e resposta imune. Cap. 17, p. 164-180. *In : micotoxinas. Perspectiva Latino americana*. vol. 1. 261p., UFRRJ, ed. Brasil. 1996.
- FREIRE, R. B.; C. C. SOUZA, L. C. H. CRUZ. Humoral immunoresponse discontinuance caused by citrinin. *IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. PM 106, p. 241, Rome, 23-31 may, 1996.
- GERBERICK, G.F. & F. SORENSON. Toxicity of T-2 toxin, a *Fusarium* mycotoxin to alveolar macrophages *in vitro*. *Environment Research*, 32:269-385. . 1983.
- HARVEY, R. B., L. F. KUBENA & M. H. ELISSALDE. Influence of vitamin E on aflatoxicosis in growing swine. *American Journal Research*, 55: 4, 572-577. 1994.
- HERZOG-SOARES, J. D. A. *Efeito in vitro da citrinina sobre macrófagos peritoniais de galinhas doadoras da raça Leghorn*. Tese de Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 43 p, 1994.
- KUBENA, L., F. R. B HARVEY, T. S. EDRINGTON, & R. ROTTINGHAUS. Influence of Ochratoxin A and Diacetoxyscirpenol single and in combination on broiler chickens. *Poultry Science*, 73:408-415. 1994.

- KUBENA, L. F., T. S. EDRINGTON, C. KAMPS-HOLTZAPPLE, R. B. HARVE & R. ROTTINGHAUS, G. E. Influence of Fumonisin B1 present in *Fusarium moniliforme* Culture Material, and T2 toxin on Turkey Poult. *Poultry Science*, 74:306-313. 1995.
- MARTORELLI, R. A. & R. B. FREIRE. Immunomodulation by the association of citrinin, ochratoxin A and aflatoxin B1 on mice splenocytes. In: *International IUPAC Symposium on mycotoxins and phycotoxins*. PM 106. p.96. Rome, 23-31 may. 1996.
- MASSOD, A. & K. S. RANJAN. Cumulative effect of vitamin C and toxin T 2 on clinical abnormalities in pigs. *Biomedical Letters*, 49: 213-217. 1994.
- MUTOH, A., K. ISHII & Y. UENO. Effects of radioprotective compounds and anti-inflammatory agents on the acute toxicity of trichotecenes. *Toxicology Letter*, 40: 165-174. 1988.
- PIER, A. C.; RICHARD, J. L. & CYZEWSKI, S. J. Implication of mycotoxins in animal diseases. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 176:719-724. 1980.
- PUSHKAREVA, M.; L. M. OBEID & Y. A. HANNUN. Ceramide: an endogenous regulator of apoptosis and growth suppression. *Immunology Today*, 16:294-302. 1995.
- QURESHI, M. A. & W. M. HAGLER. Effect of Fumonisin B1 Exposure on Chicken Macrophage Functions *in vitro*. *Poultry Science*. 71:104-112. 1992.
- SCHWARTZ, L. M. B. A. OSBORNE. Anatomical Methods in Cell Death In: *Methods in Cell Biology*. Academic Press Incorporation. 1-26. 459p. 1995.

- SHARMA, R. P., R. R. DUGYALA & K. A. VOSS. Demonstration of *in-situ* apoptosis in mouse liver and kidney after short-term repeated exposure to Fumonisin B1. *Journal of Comparative Pathology*, 117: 371-381. 1997.
- SMITH, J. W. & P. B. HAMILTON. Aflatoxicosis in the Broiler Chicken. *Poultry Science*. 49:207-215. 1970.
- SMITH, J. E. & MOSS, M. O. Mycotoxins: Formation , analysis and Significance. Bonh wiley & Sons Ltd. U. K. , 147 p. 1985.
- SOUZA, M. M.S. *Indução da blastogênese linfocitária e supressão da resposta inflamatória em camundongos albinos experimentalmente expostos a citrinina*. Tese de mestrado em Microbiologia Veterinária.UFRRJ, 68 p. 1996.
- SPEER, V. C. Interrelationships of mycotoxins, vitamin E and K in pigs, in *Proceedings. Distillers Feed Research Council*, 26: 39-46. 1971.
- STORMER F. C., MYHRE C. & WIGER R. Ochratoxin A induces apoptosis in HL 60 cells is enhanced by antioxidants. *IX International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins* . p. 226, Rome, 23-31 may, 1996.
- TERSE, P. S.; M. S. MADRYASWTRA, O. ZUROVAC, D. SRINGFELLOW, R. R. MARQUADT & B. W. KEMPPAINNEN. Comparison of *in vitro* and *in vivo* biological activity of mycotoxins. *Toxiconomy*, 31:913-919. 1993.
- UENO, Y.; K. UMEMORI, E. S. NIIMI, M. R. TANUMA, S. NAGATA, M. SUGAMATA, T. IHARA, M. SEKIJIMA, K. KAWAI, I. UENO, I & F. TASHIRO, Induction of Apoptosis by T-2 and Other Natural Toxins in HL-60 Human Promyelitic Leukemia Cells. *Natural toxins*, 3:129-137. 1995.

UNANUE, E, R. Antigen presentation of the macrophage. *Annual Veterinarian Immunology*, 2: 395-401. 1984.

YU, M. W., Y. J. ZHANG, W. S. BLANER & R. M. SANTELLA. Influence of vitamins A, C and E and beta carotene on aflatoxin B1 binding to DNA in woodchuck hepatocyt. *Cancer*, 73: 596-604. 1995.