

## \_Exposição do trato gastrointestinal à aflatoxina B<sub>1</sub>: um impacto negligenciado?

### *Exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> in the gastrointestinal tract: an overlooked impact?*

Inês Serrenho<sup>1,2</sup>, Ricardo Assunção<sup>1,3,4</sup>, Paula Alvito<sup>1,3</sup>

*paula.alvito@insa.min-saude.pt*

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

(3) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(4) Centro de Investigação em Saúde Pública. Escola Nacional de Saúde Pública, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

### \_Resumo

A exposição humana a aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) através da ingestão de alimentos contaminados e o seu impacto no trato gastrointestinal (TGI) constitui um domínio de crescente interesse científico. Para além do conhecido potencial carcinogénico, os estudos experimentais em linhas celulares, em animais e em populações humanas têm evidenciado um relevante impacto desta micotoxina no TGI, incluindo no sistema imunitário do intestino, órgão responsável por cerca de 70% das defesas do organismo. A AFB<sub>1</sub> tem a capacidade de provocar alterações na barreira intestinal afetando o seu equilíbrio e dinâmica, o que pode induzir o aparecimento de inflamações intestinais crónicas, entre outras patologias. Estas alterações podem afetar a população em geral, contudo podem constituir uma preocupação acrescida para populações vulneráveis como grávidas e crianças, em virtude da transferência de AFB<sub>1</sub> através da placenta. Assim, o presente trabalho tem como objetivo sensibilizar a comunidade científica para o potencial impacto da micotoxina AFB<sub>1</sub> no intestino e contribuir para alertar e capacitar os profissionais de saúde com conhecimento científico, por forma a atuarem, da forma mais adequada, face ao eventual aumento das patologias associadas ao TGI, que poderão ocorrer em virtude do maior número de ocorrências de contaminação alimentar por AFB<sub>1</sub>, expectável como consequência das alterações climáticas.

### \_Abstract

*Human exposure to aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) through contaminated food ingestion and its impact on the gastrointestinal tract (GIT) is a field of scientific growing interest. In addition to the recognized carcinogenic potential, experimental studies on cell lines, animals and human populations have shown a relevant impact of this mycotoxin on GIT, including on the innate immunity of the intestine, the organ responsible for about 70% of the body's defenses. AFB<sub>1</sub> has the ability to disrupt the intestinal barrier affecting its balance and dynamics, and could promote the development of chronic intestinal inflammation, among other pathologies. These conditions may affect the general population and could constitute a matter of increased concern for vulnerable populations, such as pregnant women and children, due to the AFB<sub>1</sub> transfer across the placenta. Therefore, this study aims to sensitize the scientific community for the potential impact of the mycotoxin AFB<sub>1</sub> in the GIT and to contribute to alert and empower the health professionals to act based on a deeper scientific knowledge, when faced with a possi-*

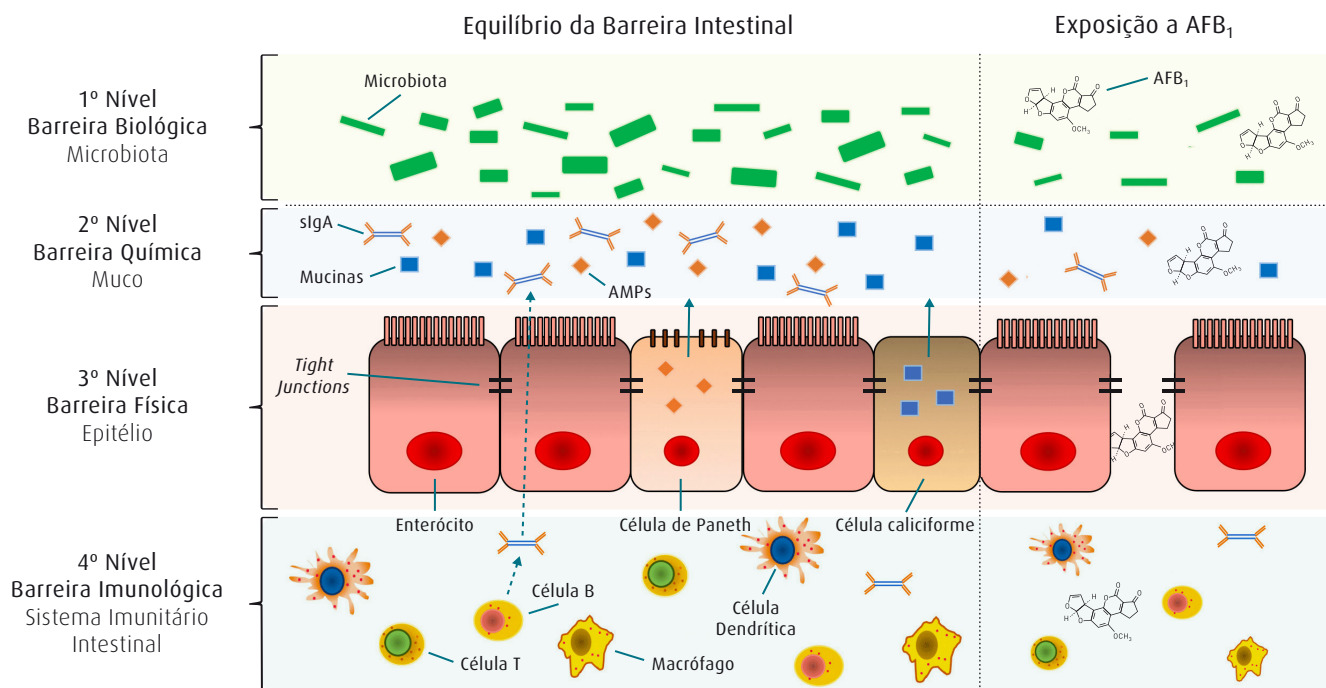
*ble increase in the number of pathologies associated to the GIT, which could occur as a result of the expected increase of food contamination by AFB<sub>1</sub> as a consequence of climate change.*

### \_Introdução

O intestino é um dos primeiros órgãos a contactar com os alimentos, após a sua ingestão. A absorção de contaminantes presentes nos alimentos, como as micotoxinas (metabólitos tóxicos produzidos por fungos) ocorre principalmente no intestino delgado (onde se efetua 90% da absorção total do que se ingere). É ainda neste órgão que ocorrem os níveis de exposição de contaminantes mais elevados (1-6). O intestino representa também a primeira linha de defesa contra possíveis infeções intestinais formando uma barreira entre o lúmen (meio externo) e a corrente sanguínea (meio interno) (4-11). A barreira intestinal está dividida em quatro níveis de proteção conforme se representa na figura 1: 1) microbiota (barreira biológica), constituída por bactérias comensais presentes no lúmen intestinal, com um papel fundamental na homeostase da saúde intestinal, 2) muco (barreira química) constituído por mucinas (MUC) e peptídeos antimicrobianos (AMPs), produzidos pelas células caliciformes e pelas células de Paneth, respetivamente, impedindo que as bactérias luminas estabeleçam um contacto direto com o epitélio, 3) epitélio (barreira física) constituído por uma monocamada de células epiteliais semipermeáveis (enterócitos) que se encontram ligadas por junções de oclusão (*tight junctions*) constituídas por proteínas transmembranares, moléculas de adesão juncional (JAMs), claudinas e ocludinas, que regulam seletivamente a passagem de nutrientes e água e impedem a passagem de moléculas nocivas, através da via paracelu-



Figura 1: Representação esquemática da barreira intestinal numa situação de homeostase (normal) e numa situação de exposição à micotoxina AFB<sub>1</sub> (adaptado de Gao, et al., 2020) (12).



slgA = imunoglobulina A secretora; AMPs = peptídeos antimicrobianos

lar e transcelular no intestino, e 4) sistema imunitário intestinal (barreira imunológica) constituído por células imunes (células dendríticas, macrófagos, linfócitos B e T) e mediadores imunológicos (citocinas e imunoglobulina A secretora (slgA)), que regulam as respostas inflamatória e imune (4,7-10,12-16).

Uma barreira intestinal equilibrada e dinâmica é essencial para que exista uma proteção eficiente. Ao afetar a barreira intestinal, a AFB<sub>1</sub> vai perturbar este equilíbrio fazendo com que haja uma disrupção da barreira e tornando o organismo mais suscetível a inflamações intestinais crónicas, alterações imunológicas e metabólicas que levam ao aparecimento de doenças inflamatórias, principalmente em indivíduos geneticamente predispostos, como é o caso da doença celíaca e de Crohn ou da colite ulcerosa (1,3,14,17-23).

Em virtude dos efeitos adversos para a saúde, o grupo das aflatoxinas (AFs) foi incluído no Regulamento (CE) n.º 1881/2006 que estabelece valores máximos de AFs em alimentos, destinados a crianças e adultos (1-3,24). Estas são produzidas por diversas espécies de fungos do género *Aspergillus* e incluem as aflatoxinas B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>),

G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) e M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>), metabolito de AFB<sub>1</sub> que pode ser encontrado no leite de mamíferos. A AFB<sub>1</sub> é o mais potente carcinogéneo hepático conhecido em mamíferos, estando por isso incluída no grupo 1 (carcinogénico para humanos), segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC, na sigla em inglês), para além disso, apresenta ainda propriedades mutagénicas, teratogénicas e imunossupressoras (11,13,16,25). Esta micotoxina está presente numa grande variedade de alimentos como é o caso dos amendoins, frutos de casca rija, frutos secos, cereais e ainda especiarias (25). Em Portugal a exposição a AFB<sub>1</sub> através do consumo de cereais foi considerada uma potencial preocupação para a saúde das crianças até aos 3 anos, em particular, as que consumiam elevadas quantidades deste grupo de alimentos (26,27). Face à evidência de que a AFB<sub>1</sub> tem a capacidade de atravessar a placenta e de ser transferida para o feto durante a gestação, tornando-o suscetível aos potenciais efeitos decorrentes desta exposição, será importante conhecer o impacto da exposição precoce a esta micotoxina. Este objetivo integra-se no âmbito do projeto earlyMYCO, que visa avaliar a exposição



## artigos breves\_ n. 7

a micotoxinas de pares mãe-filho(s) através da biomonitorização, avaliar o impacto das micotoxinas no sistema imunitário intestinal e na microbiota intestinal através de estudos *in vivo* e caracterizar o risco desta exposição (28).

Os principais efeitos agudos decorrentes da ingestão de aflatoxinas são as aflatoxicoses, que correspondem a hepatites agudas associadas a vômitos, dores abdominais e edemas, podendo, nos casos mais graves, levar à morte. Contudo um dos maiores problemas associados a esta micotoxina, é a exposição crónica podendo contribuir para o aparecimento de cancro hepático (13). Na Europa, e em particular nos países da região mediterrânica como Portugal, prevê-se um aumento de contaminação dos cereais (particularmente no milho) por AFB<sub>1</sub> em virtude da subida de temperatura decorrente das alterações climáticas, permitindo o desenvolvimento de espécies fúngicas toxigénicas em temperaturas próximas dos 33 °C, como é o caso da espécie *Aspergillus flavus*, produtor de AFB<sub>1</sub> (29,30).

É por isso importante contribuir para disseminar o conhecimento científico relativo aos efeitos adversos da exposição a AFB<sub>1</sub>, em especial para o intestino, visto a principal via de exposição a esta micotoxina ser a ingestão de alimentos, por forma a contribuir para a proteção da saúde humana e, em especial, das populações mais vulneráveis.

### \_Objetivo

Este trabalho tem como objetivo sensibilizar a comunidade para o potencial impacto da micotoxina AFB<sub>1</sub> no intestino, contribuindo para alertar e capacitar os profissionais de saúde com conhecimento científico neste domínio, por forma a gerir, da forma mais adequada, um eventual aumento das patologias associadas ao TGI. Estas poderão afetar, num futuro próximo, a população em geral, mas, em particular, as populações vulneráveis como grávidas e crianças, em virtude das alterações climáticas e do aumento da contaminação dos alimentos por AFB<sub>1</sub>, previstos para a Europa.

### \_Materiais e métodos

A pesquisa bibliográfica para este estudo foi realizada em 2021, através das bases bibliográficas *Web of Science* e *PubMed*, tendo sido efetuadas sete pesquisas individuais

incluindo os termos “Aflatoxin B<sub>1</sub>” (comum a todas as buscas) e “Caco-2 cells”, “Intestinal integrity”, “Transport”, “Intestinal immunity”, “Microbiota”, “Antimicrobial response”, “Proteins expression and tight junctions”, para o período 2000-2020. De um total de 265 referências encontradas, foram excluídas 208 (correspondendo a duplicados e estudos fora do contexto pretendido) e analisadas 57.

### \_Resultados e discussão

Face à importância das potenciais consequências nefastas para a saúde humana, decorrentes da exposição a AFB<sub>1</sub>, em particular do impacto no trato gastrointestinal (TGI), têm sido realizados diversos estudos sobre a absorção e transporte desta micotoxina no intestino, nomeadamente ao nível do muco e epitélio intestinal, aplicando metodologias *in vitro*, como a cultura e cocultura de células epiteliais intestinais humanas (5,16,31,32). Neste âmbito são descritos dois modelos de culturas celulares maioritariamente utilizados: 1) Células Caco-2, originalmente isoladas de um adenocarcinoma de cólon humano e 2) coculturas de células Caco-2 e HT29-MTX, também isoladas de um carcinoma colorrectal. As células Caco-2 são reconhecidas como modelo de referência pela *Food and Drug Administration* (FDA) mimetizando a camada epitelial do intestino delgado (enterócitos) (4,6,10). As coculturas de células Caco-2/HT29-MTX, representam um aperfeiçoamento do modelo de células Caco-2 visto que as células HT29 são capazes de produzir muco através das células caliciformes simulando de forma mais eficiente o intestino delgado nos estudos de absorção, inflamação e toxicidade (5,6).

Ao nível dos estudos da microbiota e do sistema imunitário intestinal, realizaram-se na sua maioria, estudos *in vivo* (19,20,34-36) usando ratos, mas também outras espécies, como os porcos, devido à semelhança anatómica do TGI com o dos humanos (6,23,33).

No quadro 1 encontra-se uma descrição sumarizada dos principais efeitos decorrentes da exposição a AFB<sub>1</sub>, nos quatro níveis da barreira intestinal, observados em estudos *in vitro* e *in vivo*, efetuados nas últimas duas décadas.



**Quadro 1:** ↓ Resumo dos principais efeitos da micotoxina AFB<sub>1</sub> na barreira intestinal (microbiota, muco, epitélio e sistema imunitário intestinal) obtidos através de estudos *in vitro* e *in vivo* efetuados entre 2000-2020.

Nível da barreira intestinal	Tipo de estudo/ espécie	Principais efeitos	Referências
Microbiota	<i>In vivo</i> – Ratos ( <i>Rattus</i> e <i>Mus musculus</i> )	Redução da diversidade microbiana no cólon Efeitos adversos na população de bactérias ácido-lácticas Proporção de <i>Firmicutes</i> e <i>Bacteroidetes</i> inalterada	(21,22)
	<i>In vivo</i> – Galinhas ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Aumento no número total de bactérias gram-negativas Alterações nos padrões de fermentação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(33)
	<i>In vivo</i> – Leitões ( <i>Sus scrofa domesticus</i> )	Aumento da abundância relativa dos filós <i>Bacteroidetes</i> e <i>Proteobacteria</i> Diminuição da abundância do filo <i>Firmicutes</i>	(23)
Muco (feito em AFM <sub>1</sub> )	<i>In vitro</i> – cocultura Caco-2/HT29-MTX	Modulação do mRNA e da produção das proteínas MUC2, MUC5AC e MUC5B Redução dos níveis de transcrição de MUC5B e MUC5AC	(38)
	<i>In vitro</i> – cocultura Caco-2/HT29-MTX	Alteração significativa da expressão e produção das mucinas e da abundância de proteínas Aumento significativo de proteínas MUC2 e MUCB5 seguido de uma regulação negativa das mucinas	(39)
Epitélio	<i>In vitro</i> – células Caco-2	Comprometimento da permeabilidade da barreira das células epiteliais intestinais Diminuição da área de absorção Ocorrência de inflamações e lesões intestinais	(13,25)
	<i>In vitro</i> – células Caco-2	Diminuição dos valores de resistência transepitelial (TEER) Aumento da permeabilidade paracelular	(13,25)
	<i>In vitro</i> – células Caco-2	Morte celular Danos no DNA de células diferenciadas e não diferenciadas Diminuição da expressão do mRNA de claudina-3 e ocludina	(13,15,25, 31,40-42)
Sistema imunitário intestinal	<i>In vivo</i> – Galinhas ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Aumento da suscetibilidade de galinhas a infeções intestinais por <i>S. typhimurium</i> e <i>Salmonella</i> spp. Aumento, no jejuno e no íleo, do número de macrófagos e células CD8+ e diminuição das células CD4+	(19)
	<i>In vivo</i> – Humanos ( <i>Homo sapiens</i> )	Aumento da suscetibilidade a infeções bacterianas e parasitárias Alteração da imunidade adquirida	(37)
	<i>In vitro</i> – Monócitos humanos	Diminuição da fagocitose e atividade microbicida dos monócitos da secreção de IL-1, IL-6 e do fator de necrose tumoral	(37)
	<i>In vivo</i> – Peru doméstico ( <i>Meleagris gallopavo</i> )	Respostas inflamatórias levam a infiltração de monócitos Alterações na expressão de citocinas pro-inflamatórias	(35)
	<i>In vivo</i> – Aves de capoeira ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	Regulação significativa dos transcritos de diversos genes de resposta à IL-2 Inibição da atividade dos linfócitos T e B e da produção de anticorpos e de macrófagos Alterações nos fenótipos das células T Diminuição da percentagem de células B Inibição do fator de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ e das interleucinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17	(20,36)
<i>In vivo</i> – camarão ( <i>L. vannamei</i> )	Aumento da expressão relativa de Toll, proPO, Rab, GST e IMD (genes imunes representativos importantes no intestino), seguindo-se uma diminuição total da expressão dos mesmos	(34)	



### 1. Microbiota

A maioria dos estudos sobre o efeito da AFB<sub>1</sub> na microbiota (barreira biológica) foi efetuada usando animais tendo sido referido, de uma forma geral, que existem diferenças significativas entre a composição da microbiota intestinal dos grupos controlo em comparação com as dos grupos experimentais, existindo uma maior abundância do número de espécies de bactérias e de bactérias em cada espécie, nos grupos controlo, tanto a nível do filo como do género (14,21-23,33).

### 2. Muco

A literatura disponível neste domínio foi escassa tendo sido identificados só dois estudos sobre os efeitos da micotoxina AFM<sub>1</sub> no muco (barreira química). Os resultados evidenciaram uma modulação significativa dos níveis de ácido ribonucleico mensageiro (mRNA) e produção de proteínas das mucinas MUC<sub>2</sub>, MUC5A e MUC5B, pela AFM<sub>1</sub> (metabolito da AFB<sub>1</sub>) refletindo a influência direta das AFs na composição (proteínas) e função (proteção) do muco, podendo levar a inflamações gastrointestinais e até mesmo ao aparecimento de cancro (38,39).

### 3. Epitélio

Na figura 1 representa-se esquematicamente o efeito da AFB<sub>1</sub> nas células epiteliais intestinais Caco-2 evidenciando um aumento da permeabilidade paracelular (entre duas células adjacentes) traduzida na alteração da resistência transepitelial (TEER), diminuição da área de absorção, e desencadeando processos inflamatórios e lesões intestinais (13,25). Verificou-se ainda que após a exposição, ocorria morte celular (em função do tempo e concentração), danos do ácido desoxirribonucleico (DNA) de células diferenciadas e não diferenciadas e diminuição da expressão do mRNA de claudina-3 e ocludina, nas proteínas de junção oclusiva (13,15,25,31,40-42).

### 4. Sistema imunitário intestinal

No que diz respeito aos efeitos da AFB<sub>1</sub> no sistema imunitário intestinal, verifica-se que estes são bastante complexos e a bibliografia escassa. Os seis estudos publicados revelaram, de um modo geral, um aumento da suscetibilidade dos animais e humanos (crianças) a infeções bacterianas e para-

sitárias (19,37), alteração da população de macrófagos e células imunitárias, alteração na expressão de citocinas pré-inflamatórias, inibição da atividade dos linfócitos B e T e diminuição total dos genes imunes, no intestino (20,34-37).

### \_Conclusões

Com os resultados descritos neste trabalho, evidencia-se o forte impacto que a micotoxina AFB<sub>1</sub> poderá provocar nos quatro níveis da barreira intestinal, comprometendo a imunidade do intestino e consequentemente, de todo o organismo.

A manutenção do equilíbrio intestinal é de extrema importância visto que contribui para a saúde do organismo e, por isso, perturbações, como a disfunção da barreira intestinal, podem originar efeitos adversos para a saúde humana, como é o caso das doenças inflamatórias intestinais.

Dado que se torna cada vez mais evidente que a exposição precoce a contaminantes químicos pode levar ao aparecimento de doenças no adulto, tais como infeções, cancro, diabetes e doenças autoimunes, torna-se, pois, importante desenvolver estudos que visem avaliar a importância do ambiente intrauterino e dos primeiros anos de vida na saúde da criança e do futuro adulto.

### Financiamento:

Os autores agradecem à FCT/MCTES pelo financiamento com fundos nacionais relativos ao projeto earlyMYCO (PTDC/MEDTOX/28762/2017) e ao CESAM (UIDP/50017/2020+UIDB/50017/2020). R.A. agradece pelo FCT Individual CEEC 2018 Assistant Researcher Grant CEECIND/01570/2018.

### Referências bibliográficas:

- (1) Maresca M, Fantini J. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicol.* 2010 Sep 1;56(3):282-94. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.04.016>
- (2) Vidal A, Ouhibi S, Ghali R, Hedhili A, De Saeger S, De Boevre M. The mycotoxin patulin: An updated short review on occurrence, toxicity and analytical challenges. *Food Chem Toxicol.* 2019 Jul;129:249-56. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.048>
- (3) Grenier B, Applegate TJ. Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals. *Toxins (Basel).* 2013 Feb 21;5(2):396-430. <https://doi.org/10.3390/toxins5020396>



artigos breves\_ n. 7

- (4) Gao Y, Li S, Wang J, et al. Modulation of Intestinal Epithelial Permeability in Differentiated Caco-2 Cells Exposed to Aflatoxin M1 and Ochratoxin A Individually or Collectively. *Toxins (Basel)*. 2017 Dec 27;10(1):13. <https://doi.org/10.3390/toxins10010013>
- (5) Pan F, Han L, Zhang Y, et al. Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int J Food Sci Nutr*. 2015;66(6):680-5. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792>
- (6) Markus J, Landry T, Stevens Z, et al. Human small intestinal organotypic culture model for drug permeation, inflammation, and toxicity assays. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2021 Feb;57(2):160-73. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00526-6>
- (7) Pinton P, Nougayrède JP, Del Rio JC, et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 May 15;237(1):41-8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.003>
- (8) Assunção R, Alvito P, Kleiveland CR, et al. Characterization of in vitro effects of patulin on intestinal epithelial and immune cells. *Toxicol Lett*. 2016 May 27;250 251:47-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.04.007>
- (9) Groschwitz KR, Hogan SP. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009 Jul;124(1):3-20; quiz 21-2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.05.038>
- (10) Pal S, Singh N, Ansari KM. Toxicological effects of patulin mycotoxin on the mammalian system: an overview. *Toxicol Res (Camb)*. 2017 Aug 9;6(6):764-71. <https://doi.org/10.1039/c7tx00138j>
- (11) Caloni F, Cortinovis C, Pizzo F, et al. Transport of Aflatoxin M(1) in Human Intestinal Caco-2/TC7 Cells. *Front Pharmacol*. 2012 Jun 11;3:111. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00111>
- (12) Gao Y, Meng L, Liu H, et al. The Compromised Intestinal Barrier Induced by Mycotoxins. *Toxins (Basel)*. 2020 Sep 28;12(10):619. <https://doi.org/10.3390/toxins12100619>
- (13) Robert H, Payros D, Pinton P, et al. Impact of mycotoxins on the intestine: are mucus and microbiota new targets? *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*. 2017;20(5):249-75. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1326071>
- (14) Wang Y, Wang B, Liu M, et al. Aflatoxin B1 (AFB1) induced dysregulation of intestinal microbiota and damage of antioxidant system in pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Aquaculture*. 2018;495:940-47. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.065>
- (15) Romero A, Ares I, Ramos E, et al. Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: Protective effect of illite mineral clay. *Toxicology*. 2016 Apr 15;353-354:21-33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.003>
- (16) Akbari P, Braber S, Varasteh S, et al. The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Arch Toxicol*. 2017 Mar;91(3):1007-29. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1794-8>
- (17) Liu Q, Li F, Zhuang Y, et al. Alteration in gut microbiota associated with hepatitis B and non-hepatitis virus related hepatocellular carcinoma. *Gut Pathog*. 2019 Jan 18;11:1. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0281-6>
- (18) Fang H, Wang B, Jiang K, et al. Effects of *Lactobacillus pentosus* HC-2 on the growth performance, intestinal morphology, immune-related genes and intestinal microbiota of *Penaeus vannamei* affected by aflatoxin B1. *Aquaculture*. 2020;525:735289. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735289>
- (19) Kraieski AL, Hayashi RM, Sanches A, et al. Effect of aflatoxin experimental ingestion and Eimeria vaccine challenges on intestinal histopathology and immune cellular dynamic of broilers: applying an Intestinal Health Index. *Poult Sci*. 2017 May 1;96(5):1078-87. <https://doi.org/10.3382/ps/pew397>
- (20) Park SH, Kim D, Kim J, et al. Effects of Mycotoxins on mucosal microbial infection and related pathogenesis. *Toxins (Basel)*. 2015 Oct 30;7(11):4484-502. <https://doi.org/10.3390/toxins7114484>
- (21) Yang X, Liu L, Chen J, et al. Response of Intestinal Bacterial Flora to the Long-term Feeding of Aflatoxin B1 (AFB1) in Mice. *Toxins (Basel)*. 2017 Oct 12;9(10):317. <https://doi.org/10.3390/toxins9100317>
- (22) Wang J, Tang L, Glenn TC, et al. Aflatoxin B1 Induced Compositional Changes in Gut Microbial Communities of Male F344 Rats. *Toxicol Sci*. 2016 Mar;150(1):54-63. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv259>
- (23) Grosu IA, Pistol GC, Taranu I, et al. The Impact of Dietary Grape Seed Meal on Healthy and Aflatoxin B1 Afflicted Microbiota of Pigs after Weaning. *Toxins (Basel)*. 2019 Jan 8;11(1):25. <https://doi.org/10.3390/toxins11010025>
- (24) Comissão Europeia. Regulamento (CE) n.o 1881/2006 da Comissão de 19 de dezembro, que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. JO 20.12.2006: L 364/5-24. <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>
- (25) Buszewska-Forajta M. Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. *Toxicol*. 2020 Jul 30;182:34-53. doi: 10.1016/j.toxicol.2020.04.101
- (26) Assunção R, Martins C, Vasco E, et al. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins – An overview of risk assessment under MYCOMIX project. *Food Chem Toxicol*. 2018 Aug;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>
- (27) Assunção R, Vasco E, Nunes B, et al. Single-compound and cumulative risk assessment of mycotoxins present in breakfast cereals consumed by children from Lisbon region, Portugal. *Food Chem Toxicol*. 2015 Dec;86:274-81. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.10.017>
- (28) Alvito P, Bastos-Amador P, Duarte EL, et al. Exposição precoce a micotoxinas: o contributo dos projetos MYCOMIX e earlyMYCO. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2020 maio-agosto;9(27):16-27. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7235>
- (29) Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, et al. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep*. 2016 Apr 12;6:24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>
- (30) Assunção R, Martins C, Viegas S, et al. Impacto das alterações climáticas na exposição da população portuguesa a aflatoxinas. *Boletim Epidemiológico Observações*. 2018 maio-agosto;7(22):25-28. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/5587>
- (31) Sobral MMC, Faria MA, Cunha SC, et al. Transport of mycotoxins across human gastric NCI-N87 and intestinal Caco-2 cell models. *Food Chem Toxicol*. 2019 Sep;131:110595. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110595>
- (32) Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(suppl):280-89. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.005>
- (33) Galarza-Seeber R, Latorre JD, Bielke LR, et al. Leaky Gut and Mycotoxins: Aflatoxin B1 Does Not Increase Gut Permeability in Broiler Chickens. *Front Vet Sci*. 2016 Feb 15;3:10. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00010>
- (34) Wang Y, Wang B, Liu M, et al. Comparative transcriptome analysis reveals the different roles between hepatopancreas and intestine of *Litopenaeus vannamei* in immune response to aflatoxin B1 (AFB1) challenge. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2019 Aug;222:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.006>
- (35) Monson MS, Settlege RE, Mendoza KM, et al. Modulation of the spleen transcriptome in domestic turkey (*Meleagris gallopavo*) in response to aflatoxin B1 and probiotics. *Immunogenetics*. 2015 Mar;67(3):163-78. <https://doi.org/10.1007/s00251-014-0825-y>
- (36) Monson M, Coulombe R, Reed K. Aflatoxicosis: Lessons from Toxicity and Responses to Aflatoxin B1 in Poultry. *Agriculture*. 2015;5(3):742-77. <https://doi.org/10.3390/agriculture5030742>
- (37) Turner PC, Moore SE, Hall AJ, et al. Modification of immune function through exposure to dietary aflatoxin in Gambian children. *Environ Health Perspect*. 2003 Feb;111(2):217-20. <https://doi.org/10.1289/ehp.5753>
- (38) Wu C, Gao Y, Li S, et al. Modulation of intestinal epithelial permeability and mucin mRNA (MUC2, MUC5AC, and MUC5B) expression and protein secretion in Caco-2/HT29-MTX co-cultures exposed to aflatoxin M1, ochratoxin A, and zearalenone individually or collectively. *Toxicol Lett*. 2019 Jul;309:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.010>



artigos breves\_ n. 7

- (39) Huang X, Gao Y, Li S, et al. Modulation of Mucin (MUC2, MUC5AC and MUC5B) mRNA Expression and Protein Production and Secretion in Caco-2/HT29-MTX Co-Cultures Following Exposure to Individual and Combined Aflatoxin M1 and Ochratoxin A. *Toxins (Basel)*. 2019 Feb 23;11(2):132. <https://doi.org/10.3390/toxins11020132>
- (40) Guerra MC, Galvano F, Bonsi L, et al. Cyanidin-3-O-beta-glucopyranoside, a natural free-radical scavenger against aflatoxin B1- and ochratoxin A-induced cell damage in a human hepatoma cell line (Hep G2) and a human colonic adenocarcinoma cell line (CaCo-2). *Br J Nutr*. 2005 Aug;94(2):211-20. <https://doi.org/10.1079/bjn20051425>
- (41) Zhang J, Zheng N, Liu J, et al. Aflatoxin B1 and aflatoxin M1 induced cytotoxicity and DNA damage in differentiated and undifferentiated Caco-2 cells. *Food Chem Toxicol*. 2015 Sep;83:54-60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.020>
- (42) Sobral MMC, Faria MA, Cunha SC, et al. Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells. *Chemosphere*. 2018 Jul;202:538-48. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.122>