

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA

in

SCIENZE CLINICHE E FARMACO-TOSSICOLOGICHE

VETERINARIE

Curriculum Farmaco-Tossicologico

XXIII ciclo

*Valutazione degli effetti immunotossici di diverse micotossine in
linfociti di suino e macrofagi murini.*

Tutor

Ch.ma Prof.ssa **Lorella Severino**

Coordinatore

Ch.mo Prof. **Paolo Ciaramella**

Dottorando

Dr **Rosario Russo**

Triennio 2007 / 2010

INDICE

ABSTRACT	pag. 4
1. INTRODUZIONE	
1.1 Tossicità delle micotossine nell'uomo e negli animali.....	pag. 6
1.2 Gli alimenti come veicolo di micotossine.....	pag. 8
1.3 Micotossine oggetto dello studio.....	pag. 13
1.3.1 Fumonisina B ₁	pag. 13
1.3.2 Zearalenone.....	pag. 16
1.3.3 Deossinivalenolo e nivalenolo.....	pag. 19
1.3.4 Aflatossine.....	pag. 23
2. SCOPO DEL LAVORO	pag. 30
3. MATERIALI E METODI	
3.1 Reagenti.....	pag. 31
3.2 Micotossine.....	pag. 31
3.3 Modelli cellulari: linfociti da sangue intero di suino e macrofagi murini J774A.1.....	pag. 32
3.4 Saggio di proliferazione linfocitaria.....	pag. 33
3.5 Valutazione della vitalità cellulare.....	pag. 33
3.6 Valutazione della produzione di nitriti.....	pag. 34
3.7 Valutazione dell'apoptosi cellulare.....	pag. 35
3.8 Analisi del ciclo cellulare.....	pag. 36
3.9 Analisi delle proteine Bax, ERK 1/2, caspasi-3 e PARP-1.....	pag. 36
3.10 Analisi statistica.....	pag. 37
4. RISULTATI	
4.1 Effetti di FB ₁ e α -ZEA sulla proliferazione di linfociti da sangue intero di suino.....	pag. 38
4.2 Effetti di NIV e DON sulla proliferazione di linfociti da sangue intero di suino.....	pag. 41
4.3 Effetti di NIV, DON, AFB ₁ , AFB ₂ , AFM ₁ e AFM ₂ sulla vitalità di cellule J774A.1.....	pag. 44

4.4 Effetti di AFB ₁ , AFB ₂ , AFM ₁ e AFM ₂ sull'attivazione di cellule J774A.1.....	pag. 46
4.5 Effetti di NIV, DON, AFB ₁ e AFB ₂ sull'induzione dell'apoptosi in cellule J774A.1.....	pag. 52
4.6 Effetti di NIV, DON, AFB ₁ e AFB ₂ sul ciclo cellulare in cellule J774A.1.....	pag. 54
4.7 Effetti di NIV e DON sull'espressione di <i>p</i> -ERK e Bax in cellule J774A.1.....	pag. 56
4.8 Effetti di NIV e DON sull'attivazione di caspasi-3 e PARP-1 in cellule J774A.1.....	pag. 59
5. DISCUSSIONE	pag. 61
6. CONCLUSIONI	pag. 72
BIBLIOGRAFIA	pag. 74

ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by microfungi mainly belonging to *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.* and *Penicillium spp.* frequently found as contaminants in many food products especially of vegetable origin. The climate change we have seen in recent years and the import of raw materials from developing countries have contributed to the global nature of the problem of food contamination by mycotoxins.

They are a heterogeneous group of chemicals that can lead to a broad spectrum of toxic effects in humans and animals. Many mycotoxins exert mutagenic, carcinogenic, teratogenic and immunotoxic properties. It is particularly interesting the capacity of some mycotoxins to alter normal immune response when they are present in food at levels below the ones necessary for the manifestation of clinical symptoms of mycotoxicosis. However, while the immunomodulatory effects exerted by several mycotoxins have been demonstrated both *in vivo* and *in vitro*, few studies have been carried out to date to assess the toxic effects exerted by several mycotoxins simultaneously present in the same food substrate.

Therefore, in the current work we have chosen to use immuno-competent cells such as porcine whole blood lymphocytes and murine macrophages (J774A.1 cells) as experimental models in order to evaluate the immunomodulatory activity of fumonisin B₁ (FB₁), α -zearalenol (α -ZEA), deoxynivalenol (DON), nivalenol (NIV), aflatoxin B₁ (AFB₁), aflatoxin B₂ (AFB₂), aflatoxin M₁ (AFM₁) and aflatoxin M₂ (AFM₂), alone or differently combined (1:1 ratio).

In this study, we demonstrated the cytotoxic effect exerted by different mycotoxins (α -ZEA, DON, NIV, AFB₁), individually and differently combined, in porcine lymphocytes and in J774A.1 murine macrophages. We have also shown that, in the latter cell model, NIV showed a greater cytotoxic effect than DON; moreover, AFB₁ and AFB₂ possess antiproliferative activity not shown by their hydroxylated metabolites, AFM₁ and AFM₂, respectively. However, the immunotoxic effects of the aflatoxins evaluated in the current study may be due to the inhibition of production of active oxygen metabolites such as NO. We also investigated the mechanisms

underlying the toxicity of these mycotoxins demonstrating that the antiproliferative activity shown by both trichothecenes, NIV and DON, in murine macrophages may be partly attributed to an acceleration of the apoptotic pathway that involves an increased activation of ERK protein, the induction of pro-apoptotic protein Bax, the activation of caspase-3 and cleavage of DNA repair enzyme, PARP-1. In addition, NIV and DON caused a cell cycle arrest in G₀/G₁ phase while AFB₁ was responsible for an increase in S-phase cell population.

Currently, studies are being carried out to better understand the mechanisms underlying the immunotoxicity of these mycotoxins, because the data available in literature are still few if compared to the strong impact these contaminants have on both human and animal health, in particular, underlining the potential risks arising from the co-contamination of multiple mycotoxins, very common condition which has not been taken into account yet as of now.

1. INTRODUZIONE

1.1. TOSSICITÀ DELLE MICOTOSSINE NELL'UOMO E NEGLI ANIMALI

Le micotossicosi costituiscono da tempo una complessa problematica in ambito medico-veterinario. Pur essendo poco frequenti casi di intossicazione acuta, sono stati descritti episodi di micotossicosi sia nell'uomo che negli animali. Uno degli esempi di micotossicosi umana meglio documentati risale agli anni '40, in Russia, dove fu descritta una tossicosi alimentare, denominata *aleuchia tossica alimentare*, correlata all'ingestione di cereali contaminati da funghi del genere *Fusarium*, produttori della tossina T-2 (Mayer, 1953). Tra il 1957 e il 1970, l'insorgenza di una patologia renale cronica dell'uomo, denominata successivamente *nefropatia endemica dei Balcani*, riscontrata in Bulgaria, ex Jugoslavia e Romania, fu associata al consumo di alimenti contaminati da ocratossina A (Castegnaro et al., 2006; Fuchs et al., 2005; Tanchev et al., 1991). Tuttavia, è solo a partire dagli anni '60, quando la morte di oltre centomila tacchini in Inghilterra (*Turkeys X disease*) fu messa in relazione con il consumo di mangimi a base di arachidi contaminati dalla muffa *Aspergillus flavus* (Bennett and Klich, 2003), che le micotossine sono diventate oggetto di studio dei ricercatori di tutto il mondo.

Tra il 1984 e il 1985, l'ingestione di grano contaminato da deossinivalenolo in India, Cina e Giappone causò nell'uomo l'insorgenza di una micotossicosi acuta caratterizzata da nausea, vomito, dolori addominali, diarrea, vertigini e cefalea; i sintomi comparivano tra cinque e trenta minuti dopo l'ingestione (Ramakrishna et al., 1989). Analogamente, l'ingestione da parte dell'uomo di riso contaminato da *Fusarium graminearum*, produttore di nivalenolo, è stato associato all'insorgenza della cosiddetta "*akakabi-byo*" i cui sintomi comprendevano anoressia, nausea, vomito, cefalea, dolori addominali, diarrea e convulsioni (Gutmann et al., 1975). Sono, inoltre, documentati casi di pubertà precoce in bambine del Porto Rico, tra il 1978 e 1981, dovuti verosimilmente al consumo di alimenti (carne e vegetali)

contaminati dalla micotossina zearalenone (a basse dosi)¹. Da dati epidemiologici rilevati in Cina (Wang et al., 2000; Yoshizawa et al., 1994), Sudafrica e nelle regioni del nord-est Italia (Visconti et al., 1995) appare sempre più evidente l'implicazione della fumonisina nella patogenesi del cancro esofageo nell'uomo; per tale motivo la *International Agency for Research on Cancer* (IARC), ha incluso dal 1993 la FB₁ nella categoria B2 dei probabili cancerogeni.

Col procedere degli studi, è stato identificato e caratterizzato chimicamente un numero sempre crescente di micotossine alle quali sono stati attribuiti numerosi effetti tossici. Nel 1988, in Sudafrica, furono isolate per la prima volta le fumonisine da un ceppo di *F. moniliforme*; qualche anno dopo fu definita la struttura chimica delle due principali isoforme: FB₁ e FB₂.

In seguito alla caratterizzazione della struttura chimica di molte micotossine, si è cercato di attribuire loro una specifica attività biologica e patogena. Attualmente, alle micotossine viene attribuito un ampio spettro di effetti tossici sia nell'uomo che negli animali, dovuto alla loro capacità di interagire con diversi organi bersaglio: fegato, rene, sistema nervoso, apparato riproduttivo, apparato gastro-enterico e sistema immunitario.

Gli effetti tossici delle micotossine, specie-specifici, sono conseguenza del loro peculiare meccanismo d'azione e dipendenti dalla durata dell'esposizione nonché da fattori legati all'individuo (età, sesso, status alimentare ed eventuali patologie concomitanti). Come precedentemente accennato, nell'uomo solo raramente si osservano fenomeni dovuti ad intossicazione acuta; più frequentemente, infatti, le micotossine sono responsabili di manifestazioni da intossicazione cronica. In particolare sembra che alcune micotossine esercitino azione mutagena, teratogena e cancerogena. L'aflatossina B₁, ad esempio, è tra i più potenti cancerogeni naturali per i mammiferi, nei quali determina epatocarcinoma (Hussein and Brasel, 2001) mentre, come accennato, diventa sempre più evidente il ruolo della fumonisina B₁ nell'induzione del cancro esofageo nell'uomo (Yoshizawa et al., 1994).

¹ European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 2: Zearalenone (ZEA), 22 June 2000.

Molte micotossine, ad esempio i tricoteceni, deprimono il sistema immunitario e ciò rende l'organismo più sensibile nei confronti di patologie di tipo infettivo ed infestivo e crea le condizioni predisponenti per la riacutizzazione di processi morbosi ad andamento cronico.

Negli animali da reddito, esposizioni anche a basse dosi, condizione che si riscontra frequentemente in natura, determinano anoressia, calo delle *performances* produttive e riduzione dell'incremento ponderale (Charoenpornsook et al., 1998). I ruminanti, in genere, sono meno sensibili rispetto ai monogastrici poiché, oltre alla naturale diluizione che si verifica in ambito ruminale, la flora batterica e protozoaria presente nel rumine è in grado di effettuare una parziale detossificazione delle micotossine attraverso reazioni di de-acetilazione e de-epossidazione prima del loro assorbimento (Hussein and Brasel, 2001).

1.2 GLI ALIMENTI COME VEICOLO DI MICOTOSSINE

I funghi tossigeni contaminanti possono essere classificati in due gruppi principali: *funghi da campo* e *funghi da stoccaggio*². Al primo gruppo appartengono specie che proliferano sul campo soprattutto in condizioni di particolare stress per la pianta (come periodi di siccità, carenze di minerali, aumento della salinità del suolo o infestazione da insetti) e non si moltiplicano quando le granaglie sono stoccate. Questi, però, sono sostituiti dai funghi di stoccaggio quando le condizioni di umidità, temperatura ed ossigeno lo permettono. Per esempio, il *Fusarium spp.* è un tipico fungo da campo, comunemente ritrovato sul raccolto (Gutleb et al., 2002); raramente, però, si riscontra dopo sei settimane di stoccaggio del prodotto e il suo posto viene preso da *Aspergillus* e *Penicillium*. Tuttavia, le micotossine prodotte da *Fusarium spp.*, principalmente durante la fase di coltivazione, persistono nel prodotto stoccato. La formazione delle micotossine è, infatti, strettamente connessa alla crescita fungina; tuttavia la presenza di funghi tossigeni in un alimento non implica necessariamente la presenza di micotossine. D'altronde, le micotossine possono

² Cit. Casarett and Doull's, Tossicologia, EMSI Roma, 2000.

persistere per lungo tempo dopo la morte del fungo produttore. Pertanto, l'assenza di muffe non è indice dell'assenza di micotossine (Hussein and Brasel, 2001). Non bisogna dimenticare, comunque, che la contaminazione può verificarsi durante l'intera filiera produttiva: le operazioni di essiccamento, movimentazione, trasformazione e stoccaggio, se inadeguate, possono contribuire ad aumentare il rischio della contaminazione degli alimenti.

La contaminazione degli alimenti destinati al consumo umano ed animale da parte delle micotossine è una problematica di rilevanza internazionale, coinvolgendo Paesi sia avanzati che in via di sviluppo, considerata la ubiquitarietà dei miceti in grado di sintetizzarle; è stato stimato, infatti, che circa il 25% del raccolto mondiale risulta contaminato da diverse micotossine (Hussein and Brasel, 2001).

Il clima costituisce un fattore condizionante lo sviluppo di un particolare micelio rispetto ad altri; così, ad esempio, il *Fusarium spp.* è il genere di fungo tossigeno che maggiormente si ritrova nelle regioni a clima temperato di Europa, America ed Asia (Creppy, 2002; Gutleb et al., 2002; Placinta et al., 1999) mentre nei Paesi in via di sviluppo vengono riscontrati più frequentemente i funghi appartenenti al genere *Aspergillus* in quanto il clima caldo-umido e sistemi agricoli spesso scarsamente sviluppati ne favoriscono la crescita. Tuttavia, i cambiamenti climatici possono alterare notevolmente tale scenario; si consideri, ad esempio, l'episodio di contaminazione del latte da parte dell'aflatossina M₁ a causa di un'estate particolarmente calda ed umida verificatasi nel 2003 in Italia settentrionale che ha favorito lo sviluppo di *Aspergillus flavus* sul mais utilizzato per l'alimentazione delle bovine (IZSLER, 2003). In Europa, la pioggia e le temperature altalenanti che hanno caratterizzato la primavera 2010 hanno favorito lo sviluppo di funghi tossigeni su molti substrati vegetali; l'annata 2007-2008 è stata caratterizzata da ingenti attacchi di *Fusarium spp.* al frumento coltivato in Europa comportando livelli preoccupanti di deossinivalenolo del prodotto finale (GLM, 2010³). In particolare in Italia, a causa delle sfavorevoli condizioni atmosferiche, la quasi totalità dei campioni di frumento

³ Informativa n.1/2010 "Prestare attenzione allo stato fitosanitario dei grani" del Gruppo di Lavoro Micotossine (GLM), 14 maggio 2010.

analizzati è risultata contaminata, talvolta con livelli massimi di deossinivalenolo superiori al limite massimo tollerabile (Plizzari et al., 2009).

Nonostante i tentativi di prevenzione, la contaminazione delle derrate alimentari risulta spesso inevitabile così come difficile risulta la decontaminazione del prodotto a causa della grande resistenza delle micotossine. Negli ultimi anni, in diversi paesi del mondo, si sono registrate ingenti perdite economiche dovute al calo delle esportazioni di prodotti alimentari contaminati da micotossine (Caloni e Nebbia, 2009). Durante gli ultimi otto anni, ad esempio, è aumentata l'incidenza di contaminazione da deossinivalenolo nell'avena prodotta in Norvegia, passando da livelli pari a 0 µg/kg riscontrati nel 2002 ad oltre 2000 µg/kg nel 2009 (Bernhoft, 2010). Sulla scorta di circa novecento analisi effettuate tra il 2000 ed il 2006 su mais prodotto in Francia, oltre il 50% dei campioni è risultato contaminato da fusariotossine (deossinivalenolo, zearalenone, fumonisine) oltre i livelli massimi consentiti dalla normativa vigente in ambito comunitario (Barrier-Guillot, 2007).

Gli alimenti, pertanto, costituiscono la principale fonte di esposizione dell'uomo e degli animali domestici a tali composti tossici. I principali prodotti alimentari in cui possono essere rinvenute le micotossine sono quelli di origine vegetale in particolare cereali quali frumento, mais, avena, segale, orzo e riso, ma non di rado, possono risultare contaminati altri prodotti quali frutta secca, cacao, caffè, spezie e oleaginose (Bircan, 2009; Brera et al 2009; Martins et al., 2001). Anche birra, vino e aceto possono, talvolta, essere contaminati da micotossine come l'ocratossina⁴ (Sugita-Konishi et al., 2006); il desossinivalenolo, a causa dell'elevata resistenza non solo allo stoccaggio per lunghi periodi ma anche a processi tecnologici quali macinatura e cottura (Bretz et al., 2006; Hazel and Patel, 2004), è stato rinvenuto in diversi prodotti lavorati come popcorn, farina, pane, cereali per la colazione e in diversi prodotti alimentari per l'infanzia in Europa (Schollenberger et al., 2006), USA (Hazel and Patel, 2004) e Russia (Tutelyan, 2004). Interessanti appaiono i risultati ottenuti da Schollenberger e collaboratori (2006) i quali, analizzando 125 campioni di cereali prodotti in Germania tra il 2000 e il 2001 per verificare la presenza di 16 differenti fusariotossine, hanno riscontrato in 123 di essi

⁴ Cit. ISS, 1st National Conference. *Mycotoxins in agri-food chain*, 2004.

almeno una micotossina evidenziando la presenza di deossinivalenolo con un'incidenza del 94%. Analogamente, Tutelyan (2004) ha riscontrato su 2166 campioni di cereali esaminati provenienti dalla regione del Krasnodar (Russia) una positività per il deossinivalenolo pari al 69%.

Oltre all'esposizione diretta attraverso l'assunzione di cereali e prodotti derivati contaminati, l'uomo può essere esposto alle micotossine anche attraverso il consumo di alimenti di origine animale. Talune micotossine e/o loro metaboliti possono, infatti, essere ritrovate in alimenti quali latte, uova e carne derivati da animali alimentati con mangimi o vegetali contaminati; si tratta del cosiddetto fenomeno del *carry over*.

Tra le micotossine che destano maggiori preoccupazioni sotto il profilo tossicologico, l'aflatossina M₁ (AFM₁) e l'ocratossina A (OTA) sono le più interessanti per quanto attiene al fenomeno del *carry over*. La percentuale di *carry over* dell'AFM₁ nel latte è stata stimata in percentuali variabili dallo 0.3% al 6.2% (valori più frequenti: 1-3%) con una notevole variabilità individuale influenzata sia dallo stato di lattazione (ad inizio lattazione il *carry over* può raggiungere valori 3.5 volte superiori rispetto a quello di animali a fine lattazione) sia dallo stato sanitario della mammella in quanto in presenza di patologie (mastite) la percentuale di *carry over* aumenta considerevolmente. Inoltre, prove sperimentali hanno dimostrato che nel bovino, in seguito ad un'unica somministrazione di aflatossina B₁ nella razione, l'escrezione di AFM₁ nel latte inizia circa 12 ore dopo il trattamento, raggiungendo il massimo dopo circa 24-36 ore per poi diminuire fino ad azzerarsi dopo circa 4 giorni dalla somministrazione (IZSLER, 2003). Oltre che nel latte di bovine alimentate con foraggi o insilati contaminati da aflatossina B₁ ed aflatossina B₂, le AFM₁ ed AFM₂ possono essere rinvenute anche nei prodotti lattiero-caseari essendo composti relativamente termoresistenti; infatti, i trattamenti termici di pastorizzazione e sterilizzazione non distruggono tali micotossine che risultano resistenti, tra l'altro, anche ai processi fermentativi (Prandini et al., 2009; Bognanno et al., 2006; Diaz and Espitia, 2006). Tra i prodotti lattiero-caseari sono risultati contaminati il formaggio (Motawee and McMahon, 2009; Battacone et al., 2005; Elgerbi et al., 2004) e il burro (Aycicek et al., 2002); tracce di AFM₁ sono state rinvenute anche nello yogurt

(Martins and Martins, 2004; Govaris et al., 2002; Galvano et al., 2001). L'ocratossina, invece, può essere ritrovata nel rene, nel fegato, nelle carni e nel sangue di suini alimentati con mangimi contaminati (Jorgensen and Petersen, 2002; Curtui et al., 2001). L'ocratossina A è stata ricercata anche in prodotti derivati dalla carne suina quali salsiccia, prosciutto e speck dove però sono stati evidenziati bassi livelli di contaminazione (Chiavaro et al., 2002). La carne suina e i prodotti derivati possono rappresentare, quindi, una fonte alternativa di esposizione a tale micotossina in molti Paesi europei, compresa l'Italia (Jorgensen and Petersen, 2002; Curtui et al., 2001; Thuvander et al., 2001; Dragacci et al., 1999).

Per quanto riguarda le altre micotossine che possono contaminare gli alimenti di origine animale, lo zearalenone è stato riscontrato nel fegato e nel rene di suino, aliquote di tricoteceni e di ocratossina sono state rinvenute nel tuorlo d'uovo, la sterigmatocistina nei formaggi (Cavret and Lecoeur, 2006; Hazel and Patel, 2004).

Una condizione che frequentemente si riscontra in natura è quella della co-contaminazione: più micotossine possono, cioè, contaminare lo stesso substrato contemporaneamente. La frequenza di tale condizione dipende, più che dalla possibilità che miceli differenti possano contaminare lo stesso substrato, dal fatto che uno stesso fungo può produrre micotossine diverse in relazione a piccole variazioni delle condizioni ambientali; tale fenomeno potrebbe dar luogo ad effetti delle micotossine sull'organismo bersaglio sia di tipo additivo e sinergico che di tipo antagonistico (Speijers and Speijers, 2004).

1.3 MICOTOSSINE OGGETTO DELLO STUDIO

Nel presente lavoro sperimentale, sono state prese in esame alcune micotossine rilevanti sia per il loro profilo tossicologico sia per la loro diffusione a livello internazionale nei prodotti destinati all'alimentazione umana ed animale. In particolare, è stata posta grande attenzione alle co-contaminazioni in quanto, micotossine diverse (nivalenolo e deossinivalenolo; fumonisina B₁ e α -zearalenolo; aflatossina B₁ ed aflatossina B₂) possono ritrovarsi contemporaneamente all'interno dello stesso substrato oppure perché particolari categorie di consumatori, quali i bambini, potrebbero risultare esposti a più micotossine attraverso alimenti differenti (aflatossina M₁, aflatossina M₂ e i rispettivi composti *parent* attraverso il consumo di latte e prodotti a base di latte e prodotti cerealicoli, rispettivamente). D'altronde, la contemporanea presenza di diverse micotossine, in particolare i tricoteceni, costituisce un'evenienza che si riscontra frequentemente in cereali prodotti in Europa, Asia, USA e Nuova Zelanda (Tajima et al., 2002).

Vengono di seguito descritte le micotossine oggetto del presente studio.

1.3.1 FUMONISINA B₁

Le fumonisine sono micotossine prodotte da funghi appartenenti al genere *Fusarium* come *F. verticilloides*, *F. proliferatum* e *F. nygamai*.

Dal punto di vista chimico, esse sono diesteri di acidi tricarbossilici, con un gruppo amminico disponibile; caratterizzate da una lunga catena idrocarburica simile alla sfingosina, responsabile della tossicità di tali composti (figura 1).

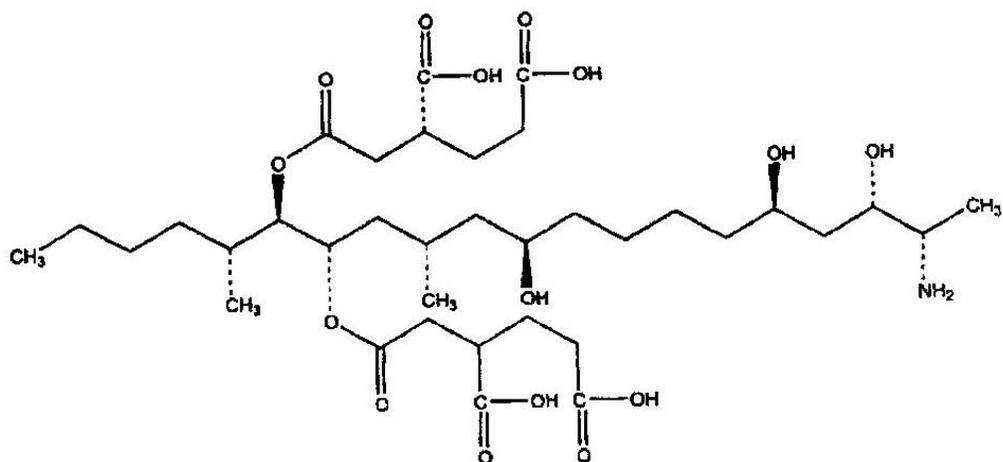


Figura 1. Struttura di fumonisin B₁.

La fumonisin B₁ (FB₁) è considerata il derivato più comune e più tossico tra le fumonisine (circa 28 molecole diverse) ed è frequentemente rinvenuta come contaminante nei cereali, in particolare nel mais, spesso in concomitanza con altre micotossine prodotte da funghi del genere *Fusarium* (EFSA, 2005).

Assunta per via ingestoria, essa viene rapidamente eliminata dall'organismo prevalentemente attraverso le feci; tuttavia tracce di micotossina possono permanere all'interno di fegato e rene, principali organi bersaglio nella maggior parte degli animali. La FB₁ non attraversa la placenta, né passa nel latte e, in generale, non si ritrova negli alimenti di origine animale⁵.

La FB₁ inibisce la sintesi ed il metabolismo degli sfingolipidi bloccando l'azione degli enzimi sfingosina-N-acetiltransferasi e sfinganina-N-acetiltrasferasi; ciò determina accumulo all'interno della cellula di basi sfingoidi libere (sfingosina e sfinganina) ed aumento del rapporto sfinganina/sfingosina. L'aumento del rapporto

⁵ European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, *Fusarium Toxins*, part 3: Fumonisin B₁ (FB₁), 17 October 2000.

sfingalina/sfingosina è pertanto considerato un marker dell'avvenuta esposizione di un organismo alle fumonisine (D'Mello et al., 1999).

L'alterazione del metabolismo degli sfingolipidi può essere considerata un evento iniziale in grado di determinare diversi effetti tossici specie-specifici⁶. Nell'uomo, ad esempio, le fumonisine sono implicate nella patogenesi del cancro esofageo come risulta dai dati epidemiologici rilevati in Cina (Su et al., 2007; Wang et al., 2000), Sudafrica e nelle regioni del nord-est Italia (Visconti et al., 1995); per tale motivo la IARC ha incluso dal 1993 la FB₁ nella categoria B2 dei probabili cancerogeni per l'uomo.

La FB₁ induce leucoencefalomalacia nell'equino (*Equine leukoencephalomalacia-ELEM*) caratterizzata da necrosi colliquativa della materia bianca del cervello, letargia, atassia, anoressia, depressione del sensorio, convulsioni e morte (Rosiles et al., 1998; Marasas, 1988). Nel suino la FB₁ causa edema polmonare (*Porcine pulmonary edema-PPE*) caratterizzato da dispnea, cianosi, debolezza, coma e morte (Ross et al., 1990); in quest'ultima specie, inoltre, sono state descritte anche lesioni epatiche e pancreatiche (D'Mello et al., 1999). Inoltre, sono stati descritti fenomeni di nefro- ed epatotossicità (apoptosi degli epatociti e dell'epitelio del tubulo renale prossimale) nei roditori (Voss et al., 2001) ed effetti neurotossici nel topo dove la micotossina, attraverso una riduzione dell'utilizzazione dell'acido folico da parte dell'embrione, causerebbe un ritardo nello sviluppo del tubo neurale (Marasas et al., 2004).

Per quanto riguarda l'azione esplicata da tale micotossina sul sistema immunitario, i dati presenti in letteratura attualmente sono alquanto contrastanti. La FB₁ influenza diverse molecole implicate nella trasduzione del segnale come la protein chinasi C (PKC), coinvolta in numerosi pathways tra cui l'induzione delle citochine, la cancerogenesi e l'apoptosi (Luongo et al., 2006). Essa, inoltre, è capace di alterare le funzioni immunitarie sia *in vitro* che *in vivo*. Studi *in vitro*, infatti, hanno dimostrato che FB₁ provoca un effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule mononucleari del sangue periferico (PBMC) di bovino stimulate con mitogeno

⁶ European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 3: Fumonisin B₁ (FB₁), 17 October 2000.

(Charoenpornsook et al., 1998). Inoltre, la FB₁ causa immunosoppressione nelle specie avicole in cui determina diminuzione della risposta anticorpale, riduzione del peso degli organi linfoidi come il timo, la milza e la borsa di Fabrizio (Cheng et al., 2006). Nelle specie da laboratorio, la FB₁ determina immunodepressione sesso-dipendente nei topi (le femmine risultano più sensibili alla FB₁; Johnson and Sharma, 2001) mentre essa risulta immunostimolante nel ratto in cui è stata osservata induzione della proliferazione linfocitaria ed attivazione dei macrofagi splenici con un incremento della produzione di ossido nitrico (Dombrink-Kurtzman et al., 2000).

1.3.2 ZEARALENONE

Lo zearalenone (ZEA) è un metabolita secondario prodotto da funghi appartenenti al genere *Fusarium spp.* come *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* (Bennett and Klich, 2003) che si ritrova soprattutto nel mais e prodotti derivati.

Strutturalmente lo ZEA è un lattone macrociclico, simile al 17 β -estradiolo (figura 2) e ciò è responsabile della sua azione tossica; esso si lega, infatti, in maniera competitiva ai recettori degli estrogeni presenti nei tessuti animali comportandosi, pertanto, da interferente endocrino (Mantovani et al., 2009; Mueller et al., 2004). Lo zearalenolo è la forma ridotta dello zearalenone e sembra avere un'attività estrogenica maggiore del suo precursore.

Tre dei suoi derivati, α -zearalanolo, **α -zearalenolo** e β -zearalanolo rispettivamente, mostrano un'affinità di legame decisamente superiore rispetto allo zearalenone, mentre l'altro derivato, il β -zearalenolo, ha un'affinità di legame minore (Creppy, 2002).

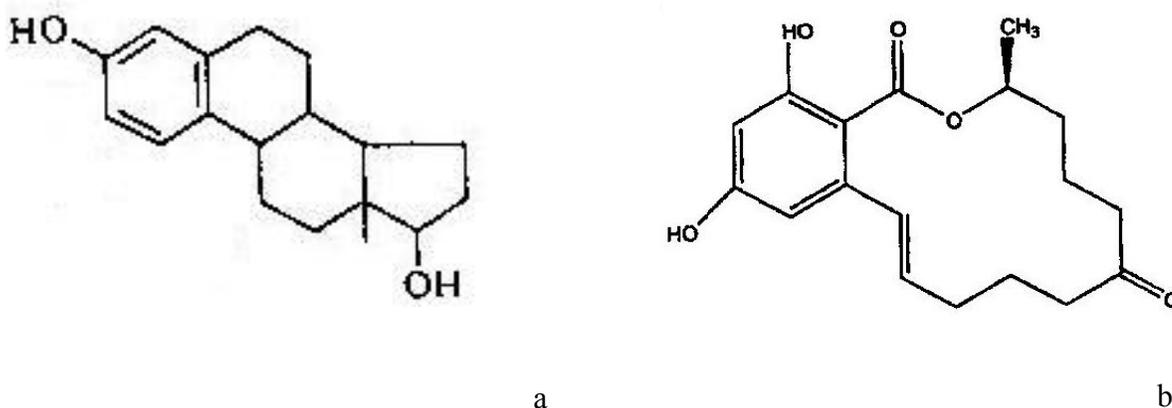


Figura 2. Struttura del 17β-estradiolo (a) e zearalenone (b).

Lo ZEA, assorbito nell'intestino, viene ridotto a livello epatico, coniugato all'acido glucuronico ed eliminato prevalentemente attraverso la bile e, in misura minore, con le urine; nell'intestino esso può essere riassorbito e metabolizzato ulteriormente nelle cellule dell'epitelio intestinale e quindi ritornare al fegato attraverso la circolazione portale. Questo ciclo entero-epatico ha l'effetto di aumentare la permanenza della micotossina nell'organismo aumentando di conseguenza, la durata dell'effetto tossico (D'Mello et al., 1999).

Molti sono gli effetti tossici che lo ZEA può indurre nell'uomo e negli animali, prevalentemente a carico degli organi riproduttori. Sono documentati casi di pubertà precoce in bambine del Porto Rico tra il 1978 e 1981, dovuti, verosimilmente, al consumo di alimenti (carne e vegetali) contaminati dalla micotossina (a basse dosi)⁷.

Lo ZEA e i suoi derivati sono classificati dalla IARC nel gruppo 3 come non cancerogeni per l'uomo, tuttavia alcuni studi dimostrano la formazione di addotti al DNA e il cambiamento del peso delle ghiandole ipofisi e tiroide (Creppy, 2002).

⁷ European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 2: Zearalenone (ZEA), 22 June 2000.

Nel suino, che rappresenta la specie domestica più sensibile alla micotossina, il consumo di mangimi contenenti quantità di ZEA inferiori a 1 ppm può determinare l'insorgenza di iperestrogenismo caratterizzato da vulva gonfia ed edematosa, prolasso vaginale, vulvovaginiti, anaestro ed infertilità (D'Mello et al., 1999). Analoghi effetti tossici sono stati osservati sia in altri animali domestici come ovini e bovini, in cui la tossina determina anche diminuzione della produzione latte, sia in diversi animali da laboratorio quali topo, ratto, porcellino d'india, criceto e coniglio (Creppy, 2002). Dosi più elevate possono causare una diminuzione della fertilità, aumento del numero di aborti, diminuzione del peso del feto ed altri problemi riproduttivi legati soprattutto ad alterazioni a carico del tessuto uterino e alla diminuita secrezione degli ormoni LH e progesterone (Bennett and Klich, 2003).

Nel suino maschio lo ZEA può determinare diminuzione dei livelli sierici di testosterone, inibizione della spermatogenesi, calo della libido e femminilizzazione (Diekman and Green, 1992). In scrofe alimentate durante la gravidanza con mangimi contaminati, il trasferimento placentare dello ZEA ha effetti teratogeni sui suinetti che spesso presentano lesioni ai genitali (D'Mello et al., 1999).

Lo ZEA mostra una bassa tossicità acuta, infatti la DL_{50} per alcuni animali da laboratorio è superiore 10000 mg/kg nel ratto (Bennett and Klich, 2003) mentre varia da 4000 a 20000 mg/kg nel porcellino d'india (Creppy, 2002). La sua azione tossica sembra comunque essere potenziata dalla contemporanea presenza di altre micotossine, come fumonisine e tricoteceni.

È noto che il sistema immunitario rappresenta un potenziale bersaglio per gli interferenti endocrini estrogenici in quanto i recettori degli ormoni estrogeni sono presenti anche in cellule immunocompetenti (Igarashi et al., 2001). Tuttavia, gli studi compiuti sugli effetti immuni dello ZEA e dei suoi metaboliti sono alquanto esigui. In particolare, lo ZEA determina inibizione della proliferazione dei linfociti di bovino (Lioi et al., 2004) ed altera la produzione di citochine (Luongo et al., 2006).

1.3.3 DEOSSINIVALENOLO E NIVALENOLO

Deossinivalenolo (DON) e nivalenolo (NIV) appartengono alla classe dei tricoteceni che costituiscono il più vasto gruppo di fusariotossine comprendenti oltre centosettanta tossine e loro derivati (Moss and Thrane, 2004) prodotte da differenti generi di funghi tra cui *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* e *F. solani*), *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Phomopsis*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium* e *Verticimonosporium* (EMAN, 2006)⁸. Si distinguono quattro sottogruppi caratterizzati da diversi gruppi funzionali all'interno della molecola; quelli più frequentemente riscontrati negli alimenti e che rivestono maggiore interesse tossicologico sono i tricoteceni **tipo A** e **tipo B**. In particolare, scirpentriolo, 15-monoacetossiscirpenolo, 4,15-diacetossiscirpenolo, tossina T-2 ed HT-2, T-2 triolo, T-2 tetraolo e neosoloaniolo appartengono al gruppo dei tricoteceni tipo A; mentre deossinivalenolo e i suoi derivati 3-acetildeossinivalenolo e 15-acetildeossinivalenolo, nivalenolo e fusarenone-X appartengono al gruppo dei tricoteceni tipo B.

Chimicamente i tricoteceni sono sesquiterpeni triciclici caratterizzati da un doppio legame tra il C9 e il C10 e con un anello epossido tra il C12 e il C13; per tale motivo vengono anche classificati come 12,13-eossi-tricoteceni (figura 3).

⁸ European Mycotoxin Awareness Network (EMAN), Basic fact sheet 8, Trichothecenes, 2006.

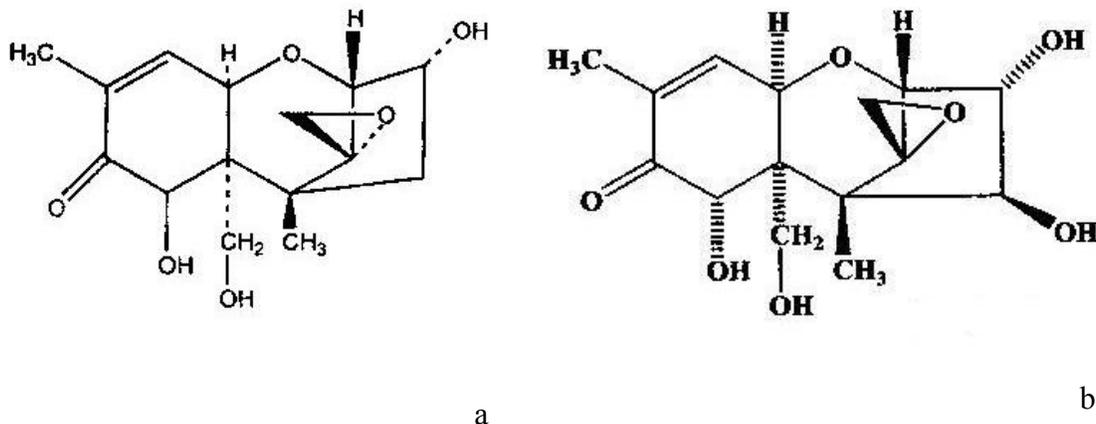


Figura 3. Struttura di deossinivalenolo (a) e nivalenolo (b).

Le condizioni ottimali per la tossinogenesi sono costituite da temperature medio-basse ed elevati livelli di umidità ambientale; i tricoteceni, pertanto, rappresentano micotossine molto diffuse in Europa (Creppy, 2002).

DON e NIV sono rapidamente assorbiti nel tratto gastro-enterico, a livello di stomaco e intestino tenue, determinando la rapida comparsa delle micotossine nel sangue. Tuttavia i meccanismi con cui i tricoteceni attraversano la mucosa enterica non sono stati ancora del tutto caratterizzati (Sergent et al., 2006; Eriksen et al., 2003).

Il DON subisce una biotrasformazione microbica in cieco, colon e retto in seguito alla quale è convertito in de-epossi-DON che possiede una minore citotossicità come è dimostrato da studi *in vitro* (Eriksen et al., 2004). Tale metabolita viene eliminato nelle feci (64%) e nelle urine (25%); tracce sono state rinvenute anche nel latte di bovini alimentati con mangimi a base di grano contaminato dalla

fusariotossina⁹ (Seeling et al., 2006). Analogamente, il NIV viene detossificato in de-
depossi-NIV ed eliminato con urine e feci (Cavret and Lecoeur, 2006).

NIV e DON, analogamente ad altre micotossine, sono specie-specifici; il
suino rappresenta la specie più sensibile, seguito da roditori, cane, gatto e specie
avicole mentre i ruminanti risultano più resistenti all'azione tossica di tali
fusariotossine (Pestka and Smolinski, 2005).

I tricoteceni sono potenti inibitori della sintesi proteica, in grado di interferire
con la fase di inizio, allungamento o terminazione di tale processo, in quanto si
legano alla subunità 60S dei ribosomi degli eucarioti; di conseguenza gli effetti
tossici si osservano soprattutto in quelle cellule e tessuti con elevato *turn-over*
proteico come linfociti e fegato (Goyarts et al., 2006; Danicke et al., 2006). Nelle
cellule eucariotiche, sono stati inoltre osservati effetti inibitori sulla sintesi di DNA e
RNA ed alterazione delle funzioni mitocondriali, del ciclo cellulare e delle giunzioni
intercellulari (Diesing et al., 2010; Rocha et al., 2005).

Il DON non ha azione mutagena e teratogena, mentre il NIV determina
aberrazioni cromosomiche e danno al DNA. Entrambe le micotossine non sono
cancerogene. Sono state, pertanto, incluse dalla IARC nella categoria 3 comprendente
i composti non classificabili come cancerogeni per l'uomo¹⁰ (Hussein and Brasel,
2001).

Il consumo di alimenti contaminati da tricoteceni causa una sintomatologia
prevalentemente a carico dell'apparato gastro-enterico caratterizzata da vomito (il
deossinivalenolo è anche noto come vomitossina), nausea, anoressia, diarrea e dolori
addominali (Pinton et al., 2010; Kolf-Clauw et al., 2009). Tali micotossine
determinano, inoltre, infiammazione cutanea e della mucosa gastrointestinale,
emorragie multiple, presenza di sangue nelle feci (Parent-Massin, 2004). Negli
animali da reddito, in particolare, il DON causa riduzioni delle *performances*
produttive e calo ponderale (Goyarts et al., 2005). Negli animali da laboratorio,

⁹ European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium
Toxins, part 1: Deoxynivalenol (DON), 2 December 1999.

¹⁰ European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium
Toxins, part 1: Deoxynivalenol (DON), 2 December 1999.

invece, in seguito ad intossicazione acuta, è stata osservata necrosi in vari tessuti come il tratto gastrointestinale, midollo osseo e tessuti linfoidei¹¹ (Schlatter, 2004).

Il NIV, tra gli altri sintomi già citati, causa anche lesioni della mucosa orale ed esofagea nel pollo e nel suino e determina dermatite del grugno nei suini (D’Mello et al., 1999). Nel topo, usato come modello sperimentale, il NIV è embriotossico ma non teratogeno non essendo osservata alcuna malformazione alla nascita¹² (Khera et al., 1982).

DON e NIV hanno entrambi un effetto immunosoppressivo che rende l’individuo maggiormente esposto ad infezioni da parte di microrganismi, in genere. Tale effetto si manifesta attraverso diminuzione della risposta anticorpale e inibizione della proliferazione linfocitaria sia *in vivo* che *in vitro* (Pinton et al., 2008), documentata anche in un modello sperimentale di linfocita T umano (Severino et al., 2006). Recenti studi hanno dimostrato, inoltre, che i tricoteceni DON e tossina T-2 non solo sono potenti inibitori della proliferazione *in vitro* delle cellule dendritiche umane, potenti cellule presentanti l'antigene coinvolte criticamente nella risposta immune primaria (Steinman, 1991), ma che essi sono anche in grado di ostacolare il processo di maturazione di tali cellule (Luongo et al., 2010; Hymery et al., 2006).

¹¹ European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 1: Deoxynivalenol (DON), 2 December 1999.

¹² European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 4: Nivalenol (NIV), 19 October 2000.

1.3.4 AFLATOSSINE

Le aflatossine sono metaboliti secondari prodotti da funghi appartenenti al genere *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus*); anche alcune specie del genere *Penicillium* quali *P. citrinum* sono in grado di produrre tali micotossine, sebbene in quantità modeste. Nonostante siano state isolate e caratterizzate circa diciotto differenti aflatossine, quelle che rivestono una maggiore rilevanza sotto il profilo tossicologico sono l'aflatossina B₁ (AFB₁), l'aflatossina B₂ (AFB₂), l'aflatossina G₁ (AFG₁) e l'aflatossina G₂ (AFG₂), nonché alcuni metaboliti quali l'aflatossina M₁ (AFM₁), prodotta dall'idrossilazione dell'AFB₁, l'aflatossina M₂ (AFM₂), prodotta dall'idrossilazione dell'aflatossina B₂, l' AFB₁-8-9-epossido e l'aflatossicolo; esso rappresenta l'unico metabolita in grado di ritrasformarsi nel composto *parent*, AFB₁.

Dal punto di vista chimico, le aflatossine presentano strutture strettamente correlate; esse sono composti eterociclici ossigenati e più precisamente dicumarine che possono contenere un anello lattonico a sei atomi (figura 4). Le aflatossine sono facilmente riconoscibili per la diversa colorazione che assumono se esposte alla luce UV, apparendo blu le AFB₁ ed AFB₂ e verdi le AFG₁ ed AFG₂.

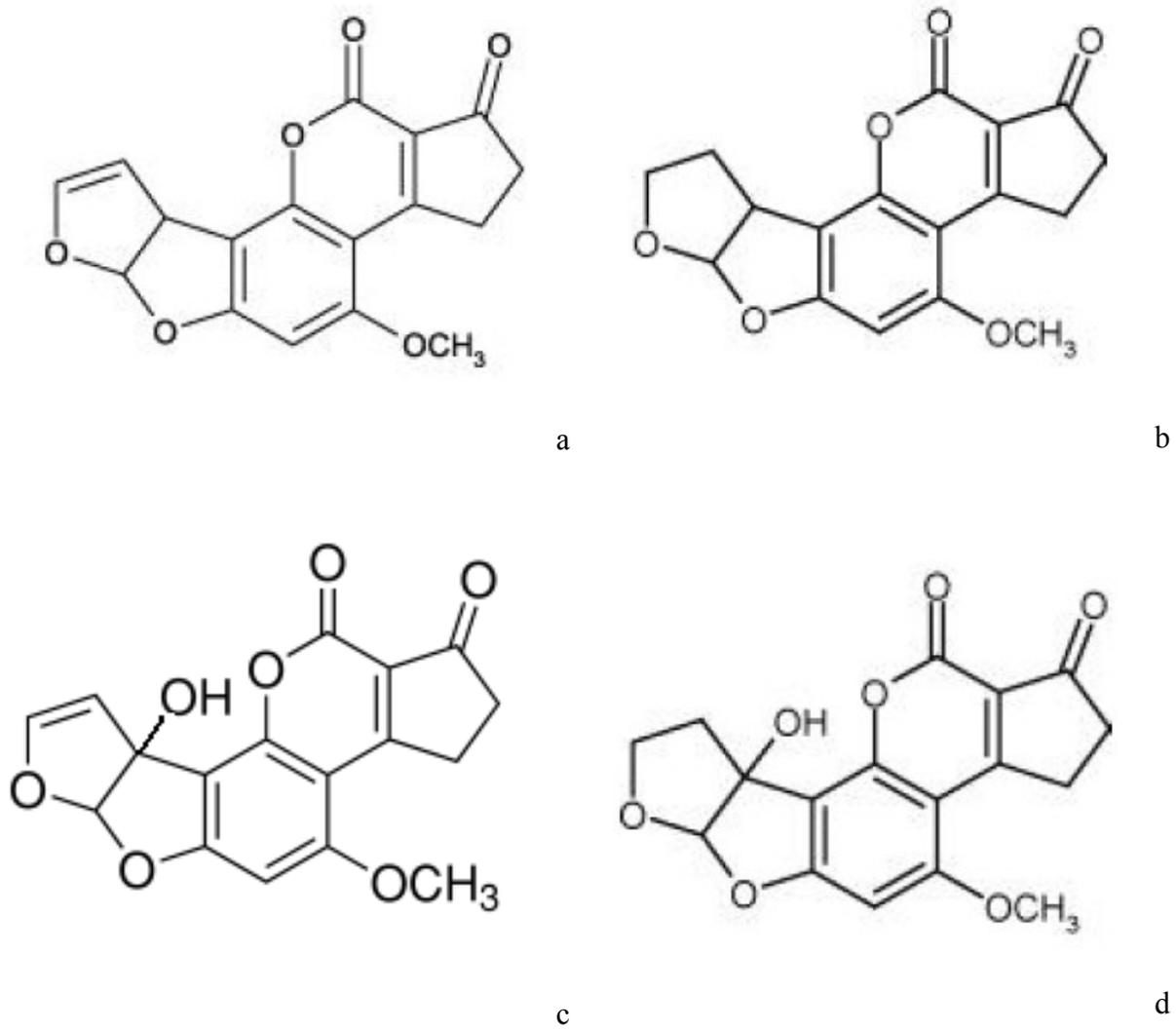


Figura 4. Struttura di aflatoxina B₁ (a), aflatoxina B₂ (b), aflatoxina M₁ (c) ed aflatoxina M₂ (d).

I funghi produttori di aflatossine possono infestare i prodotti vegetali sia durante la coltivazione sia durante le fasi di raccolto e stoccaggio del prodotto. Come precedentemente esposto, oltre ad alimenti di origine vegetale, anche prodotti di origine animale quali il latte e i prodotti lattiero-caseari possono risultare contaminati da AFM₁ ed AFM₂ (Motawee and McMahon, 2009).

Le condizioni di crescita ottimali per il micelio fungino sono rappresentate da temperatura compresa tra 36 e 38 °C, umidità del substrato (aw) pari a 0.82 ed umidità ambientale dell' 85%, mentre la maggiore produzione di micotossine si verifica ad una temperatura compresa tra 24 e 27 °C per AFB₁ e tra 29 e 30 °C per AFG₁ (Caloni F. e Nebbia C., 2009). Le particolari condizioni climatiche (estate particolarmente calda ed umida) verificatesi nel 2003 in Italia settentrionale, unitamente ad altri fattori (eccessiva permanenza in campo, infestazione da parte di parassiti, elevata umidità della granella, mancata o inadeguata essiccazione del prodotto) hanno favorito la contaminazione del mais; i risultati di un monitoraggio effettuato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna hanno evidenziato che il 34% dei campioni esaminati di latte prodotto in Emilia Romagna risultava contaminato da AFM₁ di cui il 22.7% oltre l'attuale limite massimo (50 ng/kg) stabilito dal Regolamento CE 1881/2006 (IZSLER, 2003).

La principale via di esposizione alle aflatossine è rappresentata da quella ingestoria, sebbene anche la via inalatoria possa costituire una rilevante via di esposizione in determinate categorie di individui quali i lavoratori di mangimifici e gli addetti all'alimentazione degli animali allevati, nonché per gli stessi animali, esposti alle polveri aereodisperse che si vengono a generare in seguito alla movimentazione di mangimi contaminati (Kelman et al., 2004). Uno studio *in vivo* ha dimostrato che AFB₁ riduce la capacità di fagocitosi e la produzione di TNF in macrofagi alveolari in seguito ad esposizione per via aerea (Jakab et al., 1994). In seguito all'assunzione orale, le aflatossine vengono assorbite dal tratto gastroenterico, principalmente a livello duodenale, e legate alle albumine plasmatiche sono poi trasportate al fegato dove possono subire sia un'attivazione che una detossificazione. In generale, esiste una notevole variabilità del profilo metabolico sia su base specie-specifica sia individuale (polimorfismi genetici relativi all'espressione di enzimi

metabolizzanti gli xenobiotici, età, sesso, stato di salute, abitudini di vita) (Caloni e Nebbia, 2009). Il metabolismo epatico risulta mediato principalmente dal citocromo P450 microsomiale che origina un numero considerevole di metaboliti (figura 5). Un recente studio ha dimostrato che l' AFB₁ può subire biotrasformazione con conseguente formazione di AFM₁ anche nelle cellule epiteliali di mammella di bovino (Caruso et al., 2009).

Come già precedentemente riportato, AFM₁ ed AFM₂ vengono eliminate con il latte; altre importanti vie di escrezione sono rappresentate dall'urina (AFB₁ ed AFB₂) e dalla bile (SGH-coniugati) mentre una piccola quantità di micotossina può essere escreta anche con le feci.

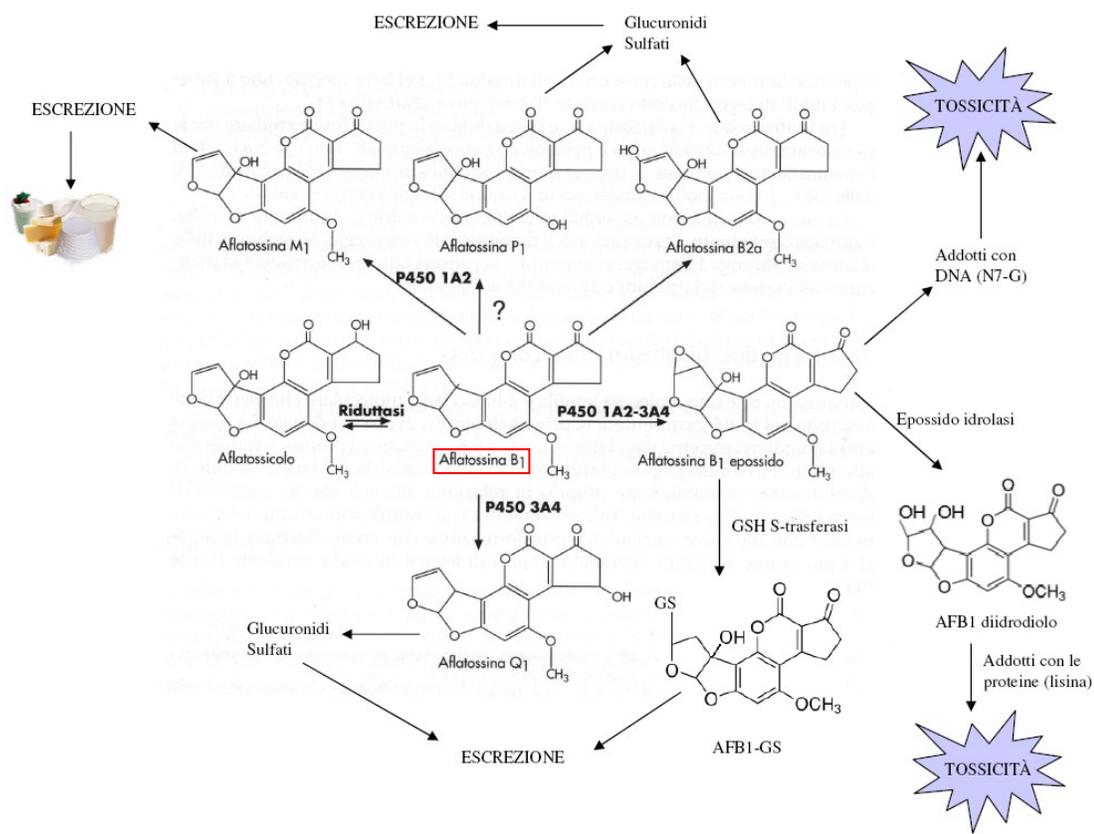


Figura 5. Principali vie metaboliche dell'AFB₁ (da: Nebbia, 2009 modificato).

Tra le varie aflatossine, l'AFB₁ rappresenta quella maggiormente studiata sia per la sua diffusione sia per la sua maggiore tossicità. Essa, infatti, rappresenta il più potente epatocancerogeno naturale per diverse specie animali, uomo compreso, classificata dalla IARC nel gruppo 1B (cancerogeni certi per l'uomo). Inoltre, l'AFB₁ sembra possedere anche proprietà teratogene, mutagene ed immunosoppressive (EFSA, 2004).

La specie più sensibile agli effetti tossici di AFB₁ è la trota; particolarmente sensibili risultano inoltre l'anatroccolo, il tacchinotto, il pulcino, il coniglio, il ratto, il cane ed il suino. L'ovino rappresenta la specie più resistente (Caloni e Nebbia, 2009).

Il principale organo bersaglio, in tutte le specie, è il fegato in cui le aflatossine causano necrosi centrolobulare ed iperplasia dei dotti biliari. L'intossicazione cronica da aflatossine nell'uomo si manifesta con patologie variabili dal carcinoma all'epatite cronica accompagnata da epatomegalia e cirrosi. Negli animali domestici, essa si manifesta generalmente con incremento dell'incidenza di alcune malattie infettive e/o infestive, diminuzione dell'efficienza riproduttiva e dell'incremento ponderale; altri sintomi che possono comparire nei ruminanti sono riduzione della produzione lattea ed alterazione dell'attività ruminale, nei volatili si osserva una diminuzione dell'ovodeposizione mentre l'equino può presentare anoressia, depressione, febbre, tremori, atassia e tosse (Caloni and Cortinovis, 2010). In corso di intossicazione acuta, invece, si riscontrano apatia, anoressia, dimagrimento, arresto dell'accrescimento ai quali seguono generalmente ittero, emorragie epatiche, enterite emorragica, edema polmonare, convulsioni ed encefalopatia che può provocare il decesso dell'animale intossicato (Meucci, 2010).

Diversi effetti tossici sul sistema immunitario sono stati descritti in corso di intossicazione da aflatossine. Studi sia *in vitro* che *in vivo* hanno dimostrato che l'AFB₁ risulta immunotossica, in particolare essa esplica la sua azione a carico dell'immunità cellulo-mediata attraverso riduzione del numero di linfociti circolanti (Hinton et al., 2003; Silvotti et al., 1997), inibizione della blastogenesi linfocitaria in diverse specie animali (Meissonnier et al., 2008; Wada et al., 2008), alterazione dell'attività di cellule NK e dell'espressione di citochine (Methenitou et al., 2001). L'AFB₁ sembra inoltre capace di alterare la funzionalità macrofagica inibendo la produzione di NO in macrofagi murini (Moon and Pyo, 2000; Moon et al., 1998), la fagocitosi in macrofagi alveolari di suino (Liu et al., 2002) e la capacità di presentare l'antigene ai linfociti T (Meissonnier et al., 2008).

Tuttavia, sebbene siano stati effettuati diversi studi sia *in vitro* che *in vivo* al fine di valutare gli effetti immunomodulatori dell'AFB₁, del tutto carenti risultano quelli relativi all'immunotossicità dell'AFM₁ mentre nessun lavoro è stato finora condotto per valutare gli effetti di AFB₂, AFM₂ e delle combinazioni di tali xenobiotici sul sistema immunitario.

Tra i metaboliti che rivestono maggiore rilevanza tossicologica, vanno annoverati AFM₁ ed AFM₂ a causa della loro presenza nel latte e derivati. Pur essendo dei prodotti di detossificazione, AFM₁ ed AFM₂ presentano un profilo tossicologico sovrapponibile a quello dei composti *parent*, AFB₁ e AFB₂ rispettivamente; tuttavia, essi sono dotati di una cancerogenicità epatica nettamente inferiore (circa 10%) rispetto ai corrispondenti progenitori (gruppo 2B IARC: probabili cancerogeni per l'uomo).

Un altro metabolita importante relativamente alla sua tossicità è l' AFB₁-8-9-epossido, instabile ed altamente reattivo in grado di formare addotti con le macromolecole presenti nelle cellule (ad esempio, AFB-N7-guanina). Tale epossido viene detossificato mediante reazioni di coniugazione con il glutatione catalizzate dall'enzima glutatione *S*-trasferasi la cui attività risulta molto variabile nelle diverse specie animali; a tale fenomeno può essere attribuita la differente sensibilità interspecifica (Fink-Gremmels, 1999).

2. SCOPO DEL LAVORO

Il principale obiettivo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare gli effetti immunomodulatori di differenti micotossine (fumonisin B₁, α -zearalenolo, deossinivalenolo, nivalenolo, aflatossina B₁, aflatossina B₂, aflatossina M₁ ed aflatossina M₂) in due modelli di cellule immuno-competenti: *linfociti di suino* in coltura primaria e *macrofagi murini* in coltura continua (cellule J774A.1).

Nello studio di tali cellule, particolare attenzione è stata data alla valutazione delle interazioni tra più micotossine sia perché la co-contaminazione di uno stesso prodotto alimentare rappresenta un'evenienza piuttosto frequente in condizioni naturali, sia perché il consumatore può risultare esposto a molteplici micotossine anche attraverso il consumo di alimenti diversi. In considerazione di ciò e vista l'esiguità di lavori scientifici circa i potenziali rischi derivanti dalle interazioni tra più micotossine, un ulteriore scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di valutare possibili interazioni di tipo additivo, sinergico od antagonista.

La prima parte del lavoro, riguardante la valutazione immunotossica di quattro fusariotossine (FB₁, α -ZEA, DON, NIV e le combinazioni FB₁+ α -ZEA e NIV+DON) in linfociti di suino in coltura primaria, rappresenta la conclusione di un lavoro precedentemente svolto dal nostro gruppo in cellule Jurkat, modello stabilizzato di linfocita T umano.

La seconda parte, riguardante la valutazione degli effetti immunotossici delle micotossine (DON, NIV, AFB₁, AFB₂, AFM₁ ed AFM₂ e le combinazioni NIV+DON, AFB₁+AFB₂, AFM₁+AFM₂, AFB₁+AFM₁ ed AFB₂+AFM₂), in un modello cellulare costituito da macrofagi murini J774A.1 rappresenta, invece, la prima parte di uno studio che si concluderà con l'impiego di un secondo modello cellulare rappresentato da linfociti di bovino, specie animale nella quale alcuni metaboliti idrossilati delle aflatossine sono eliminati attraverso il latte.

3. MATERIALI E METODI

3.1 REAGENTI

I terreni di coltura (RPMI-1640 e DMEM), la L-glutammina, la streptomina, la penicillina, gli aminoacidi non essenziali (NEAA), il siero fetale bovino (FBS), la concanavalina A (C 0412), le micotossine, deossinivalenolo (D-0156), nivalenolo (N-7769), aflatossina B₁ (A6636) ed aflatossina B₂ (A9887) e i reagenti per il test dell' MTT e per il Western blot sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich s.r.l. (Milano, Italia). Le aflatossine M₁ (ALX-630-095-MC01) ed aflatossina M₂ (ALX-630-114-MC01) sono state acquistate dall' ENZO Life Sciences Inc. (Plymouth, PA, USA). Infine, gli anticorpi utilizzati per i Western blot sono stati acquistati dalla Santa-Cruz Biotechnology, s.r.l (Milano, Italia).

3.2 MICOTOSSINE

La fumonisina B₁ è stata solubilizzata in PBS; α -zearalenolo, nivalenolo, aflatossina B₁, aflatossina B₂, aflatossina M₁ ed aflatossina M₂ sono state solubilizzate in metanolo mentre il deossinivalenolo in etanolo; tutte sono state poi ulteriormente diluite in terreno completo al fine di ottenere le concentrazioni desiderate. Sono stati effettuati esperimenti preliminari per verificare un eventuale effetto citotossico esercitato dal solvente utilizzato per solubilizzare le micotossine (dati non mostrati). La concentrazione del solvente a contatto con le cellule è risultata sempre inferiore a 2% (v/v).

3.3 MODELLI CELLULARI: LINFOCITI DA SANGUE INTERO DI SUINO E MACROFAGI MURINI J774A.1

1) Coltura cellulare: linfociti da sangue intero di suino

Per ottenere i linfociti sono stati prelevati campioni di sangue da 26 suini, razza Landrace norvegese, clinicamente sani, di età compresa tra i 3 e i 5 mesi. I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena cava craniale in tubi vacutainer contenenti 7 ml di eparina 150 IU. I campioni di sangue sono stati diluiti 1:20 con RPMI 1640 contenente L-glutammina (2mM), penicillina (100U/ml), streptomina (100 µg/ml), aminoacidi non essenziali (NEAA) 1% (w/v), 2-mercaptoetanololo 5×10^{-5} M e siero autologo inattivato al calore (2% v/v). Le cellule sono state poste in incubatore a 37 °C ed atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂. Il terreno di coltura è stato rinnovato ogni 2 giorni, in tal modo le cellule sono state mantenute in una fase di crescita esponenziale.

2) Coltura cellulare: macrofagi murini J774A.1

Macrofagi murini J774A.1 (American Type Culture Collection, ATCC) sono stati coltivati in piastre Petri in mezzo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) addizionato con 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS) inattivato al calore, HEPES (25 mM), glutamina (25 mM), penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml). Le cellule sono state poste in incubatore a 37 °C ed atmosfera umidificata contenente 5% di CO₂. Il terreno di coltura è stato rinnovato ogni 2 giorni, in tal modo le cellule sono state mantenute in una fase di crescita esponenziale.

3.4 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE LINFOCITARIA

La concentrazione ottimale di concanavalina A (Con A) da utilizzare come mitogeno è stata valutata preliminarmente. A tale scopo sono stati dispensati 100 µl di sangue diluito e 100 µl di mezzo di coltura in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto; i campioni sono stati quindi stimolati con concentrazioni crescenti di Con A mentre i controlli sono stati incubati con il solo mezzo di coltura. Individuata la concentrazione ottimale del mitogeno, è stato avviato l'esperimento dispensando 100 µl di sangue diluito stimolato con Con A (10 µg/ml) e 100 µl di terreno di coltura contenente concentrazioni crescenti delle quattro micotossine (FB₁, α-ZEA, NIV e DON) sia singolarmente che in combinazione. Il controllo negativo è costituito da sangue non stimolato mentre il controllo positivo da sangue stimolato e non esposto alle micotossine. Le colture cellulari sono state quindi incubate per 24, 48 e 72 ore a 37 °C in atmosfera umidificata contenente CO₂ al 5%. Nelle ultime 16 ore è stata aggiunta la [³H]-timidina (20 µl/pozzetto) quale marker di sintesi di DNA. Successivamente, alle cellule trasferite su filtri montati in micropiastre, è stato aggiunto il liquido di scintillazione (MicroscintTH 40, A Packard Bioscience Company, 25µl/pozzetto) ed infine è stata effettuata la conta delle cellule espressa in cpm (conta per minuto) al β-scintillatore TopCount.

3.5 VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ CELLULARE

Macrofagi murini J774A.1 sono stati seminati in multiwell da 96 pozzetti con fondo piatto ad una densità pari a 3.5×10^5 cellule/ml e lasciati aderire per 3 ore. Quindi il mezzo è stato sostituito con 90 µl di mezzo fresco e 10 µl di ciascuna micotossina opportunamente diluita al fine di ottenere la concentrazione desiderata (NIV e DON: 10-100 µM; AFM₁ e AFM₂: 0.05-30 µM; AFB₁ e AFB₂: 0.5-50 µM). Gli effetti sulla vitalità cellulare sono stati valutati incubando le cellule in presenza delle micotossine singolarmente e diversamente combinate tra loro (rapporto 1:1) per 24, 48 e 72 ore mediante il saggio colorimetrico basato sul bromuro di 3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT (Mosmann, 1983). Dopo il periodo di incubazione in presenza delle micotossine, sono stati aggiunti 25 µl di MTT (5 mg/ml) a ciascun pozzetto e le cellule sono state incubate per altre 3 ore; la conversione del MTT in cristalli di formazano (di colore viola ed insolubili in acqua) ad opera delle deidrogenasi mitocondriali delle cellule vitali è stata utilizzata come indice di vitalità cellulare. Successivamente le cellule sono state lisate ed i cristalli di formazano sono stati solubilizzati utilizzando 100 µl di una soluzione (pH 4.5) contenente 50% (v/v) di N,N-dimetilformamide e 20% (w/v) di SDS. Infine è stata misurata spettrofotometricamente la densità ottica (OD) di ciascun pozzetto ad una lunghezza d'onda di 620 nm. La vitalità cellulare è stata quindi ottenuta mediante la seguente formula:

$$\% \text{ di vitalità} = (\text{OD cellule trattate} / \text{OD cellule di controllo}^*) \times 100$$

* come controllo è stata utilizzata una sospensione cellulare di macrofagi J774A.1 non esposta alle micotossine.

3.6 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI NITRITI

L'attivazione dei macrofagi J774A.1, manifestata dall'aumentato rilascio di NO nel mezzo di coltura, è stata valutata in cellule pretrattate con concentrazioni crescenti di AFM₁, AFM₂, AFB₁, AFB₂, singolarmente e in combinazione (AFM₁+AFM₂, AFB₁+AFB₂, AFM₁+AFB₁, AFM₂+AFB₂) per 24 ore, e successivamente esposte alle micotossine e stimolate con LPS (1 µg/ml) per ulteriori 24 ore. Dopo tale periodo, 100 µl di surnatante è stato depositato in piastre da 96 pozzetti in presenza di 100 µl di reattivo di Greiss [1% (w/v) sulfanilammide e 0.1 % (w/v) naftiletilendiamina in acido fosforico al 5%] ed incubati a temperatura ambiente per 10 minuti al buio. La densità ottica è stata misurata con uno spettrofotometro (Multiscan-ex) dotato di filtro a 550 nm. L'ossido nitrico è molto instabile e viene rapidamente convertito in NO₂⁻, utilizzato pertanto come indicatore della produzione

di NO (Moon et al., 1999). Le concentrazioni di NO_2^- sono state estrapolate da una curva standard di NaNO_2 preparata con lo stesso mezzo di coltura adoperato per l'allestimento dei campioni. Infine, i risultati sono stati espressi come concentrazione (μM) di NO_2^- prodotto dai macrofagi J774A.1 incubati con le micotossine e stimolati con LPS. Come bianco è stato utilizzato il solo mezzo di coltura.

3.7 VALUTAZIONE DELL' APOPTOSI CELLULARE

L'attività proapoptotica in macrofagi murini J774A.1 da parte delle micotossine oggetto del lavoro di tesi è stata analizzata valutando la formazione di nuclei ipodiploidi, tipici del processo apoptotico, dopo trattamento con diluizioni seriali delle differenti micotossine. La percentuale di nuclei ipodiploidi è stata rilevata trattando le cellule con ioduro di propidio (PI) ed effettuando lettura al citofluorimetro a flusso. Macrofagi J774A.1 sono stati coltivati in piastre da 24 pozzetti ad una densità pari a 2.5×10^5 cellule per pozzetto in presenza delle micotossine, singolarmente (NIV, DON, AFB_1 e AFB_2) ed in combinazione ($\text{NIV}+\text{DON}$ e $\text{AFB}_1+\text{AFB}_2$) ed incubate per 24, 48 e 72 ore. Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state lavate con PBS e risospese in 500 μl di una soluzione contenente 0.1% di citrato di sodio, 0.1% di Triton X-100 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ di PI. Dopo incubazione per 30 minuti a 4 °C al buio, i nuclei delle cellule sono stati analizzati mediante citometria a flusso utilizzando il FACScan (Necton Dickinson) ed il programma CellQuest. I detriti cellulari sono stati esclusi dall'analisi mentre il contenuto di DNA dei nuclei cellulari è stato riportato in scala logaritmica ed espresso come percentuale di cellule ipodiploidi.

3.8 ANALISI DEL CICLO CELLULARE

Macrofagi J774A.1 sono stati piastrati ad una densità pari a 2×10^5 cellule per pozzetto in multiwell da 12 pozzetti ed incubati per 24 ore in presenza delle micotossine NIV e DON (25 μ M) oppure con AFB₁ e AFB₂ (5-50 μ) singolarmente ed in combinazione. Al termine del periodo di incubazione, le cellule sono state lavate con PBS e quindi raccolte utilizzando 250 μ l di tripsina, trasferite in tubicini per citofluorimetro e poi centrifugate a 2000 rpm per 5 minuti a 4 °C. Il pellet è stato infine risospeso in 500 μ l di PI e 500 μ l di DMEM base ed incubato per 30 minuti a 4 °C. I campioni sono stati, quindi, analizzati al FACS utilizzando il programma Mod FitLT.

3.9 ANALISI DELLE PROTEINE BAX, ERK 1/2, CASPASI-3 E POLI-ADP-RIBOSIO POLIMERASI (PARP-1)

Macrofagi murini J774A.1 sono stati seminati in piastre P60 (1.5×10^6 cellule/piastra) e lasciati aderire per due ore in incubatore; quindi sono stati aggiunti i due tricoteceni, NIV e DON (25 μ M) dopo aver sostituito il mezzo con mezzo fresco. Le cellule sono state quindi incubate per ulteriori 24 ore. Al termine di tale periodo, sono state recuperate le proteine totali mediante cicli ripetuti di gelo/scongelo nel buffer di lisi (50 mM Trizma-HCL) e quantificate mediante il saggio Biorad. Sono stati caricati 50 μ g di proteine totali in ciascun pozzetto di un gel di poliacrilamide e separate mediante SDS-PAGE in condizioni denaturanti. Le proteine separate sono state quindi trasferite su una membrana di nitrocellulosa mediante elettroforesi (100 mA per 45 minuti; transfer buffer: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanolo); i legami aspecifici sono stati evitati incubando la membrana in un buffer contenente 5% di latte in polvere in TBS/0.1% Tween (25 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% di Tween) per 60 minuti. La membrana, quindi, è stata incubata overnight a 4 °C, previo lavaggio, in presenza dell'anticorpo primario specifico per la proteina da evidenziare (anti-Bax, anti-pERK, anti-caspasi-3, anti-PARP-1 e anti-tubulina, utilizzata come

proteina di riferimento). In seguito al lavaggio con un washing buffer (TBS/0.1% Tween) è stato aggiunto l'anticorpo secondario (anti-mouse 1:1000 o anti-rabbit 1:5000) e lasciato agire per un'ora a temperatura ambiente. Le bande proteiche sono state quindi visualizzate su lastre fotografiche e sottoposte ad analisi densitometrica mediante il software Gel-Doc 2000 e normalizzate sui livelli di tubulina di ciascun campione.

3.10 ANALISI STATISTICA

I risultati di tutti gli esperimenti effettuati sono espressi come media \pm l'errore standard della media di almeno tre esperimenti indipendenti. Tali risultati sono stati elaborati statisticamente mediante analisi della varianza ANOVA, test di Bonferroni o test t-Student. Sono stati considerati statisticamente significativi valori di $P < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 EFFETTI DI FB₁ E α -ZEA SULLA PROLIFERAZIONE DI LINFOCITI DA SANGUE INTERO DI SUINO

In figura 6 sono riportati i risultati ottenuti in seguito all'incubazione dei campioni di sangue con le due micotossine, FB₁ e α -ZEA per 24 ore. I risultati dell'incubazione in presenza delle micotossine per 48 e 72 ore hanno evidenziato un andamento simile a quello osservato a 24 ore (dati non mostrati); pertanto, è stato scelto quest'ultimo come periodo di esposizione ottimale sia per la valutazione degli effetti delle singole micotossine sia per la combinazione. Concentrazioni crescenti di FB₁ (0.5-80 μ M) non alterano in maniera significativa la capacità proliferativa dei linfociti di suino (figura 6A). Il trattamento con concentrazioni crescenti di α -ZEA (0.5-20 μ M), al contrario, induce un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare; tale effetto risulta essere dose-dipendente e diventa statisticamente significativo a partire dalla concentrazione di 5 μ M (figura 6B).

È stato successivamente valutato l'effetto della co-incubazione di FB₁+ α -ZEA (rapporto 1:1) sulla proliferazione di linfociti di suino, in un *range* compreso tra 0,5 e 20 μ M (figura 7). I risultati ottenuti evidenziano che le due micotossine quando sono presenti contemporaneamente esercitano un effetto inibitorio sulla proliferazione linfocitaria che risulta essere maggiore rispetto a quello causato dal solo α -ZEA. Nella co-incubazione, infatti, è stato osservata un'inibizione significativa della proliferazione cellulare a partire dalla concentrazione pari a 2,5 μ M di FB₁ + 2,5 μ M di α -ZEA, mentre lo stesso effetto si ottiene con una concentrazione di α -ZEA pari a 5 μ M, lasciando ipotizzare un'interazione tra le due micotossine di tipo sinergico.

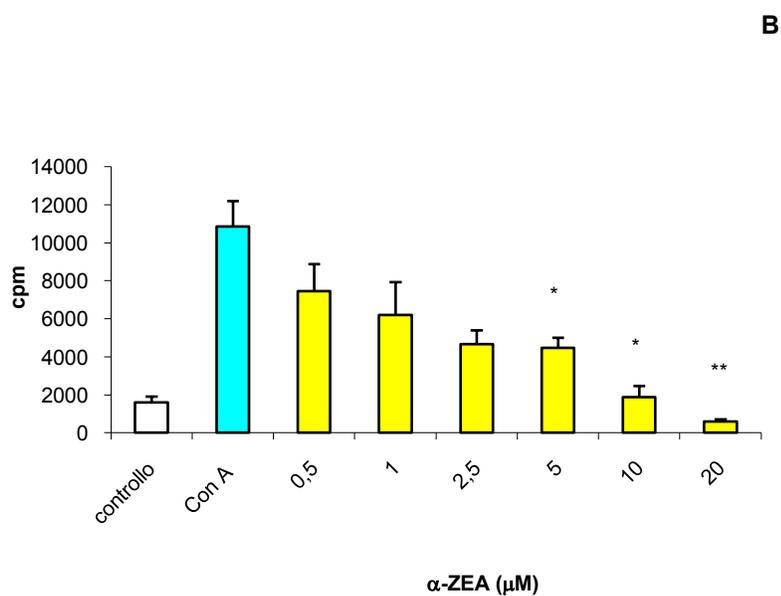
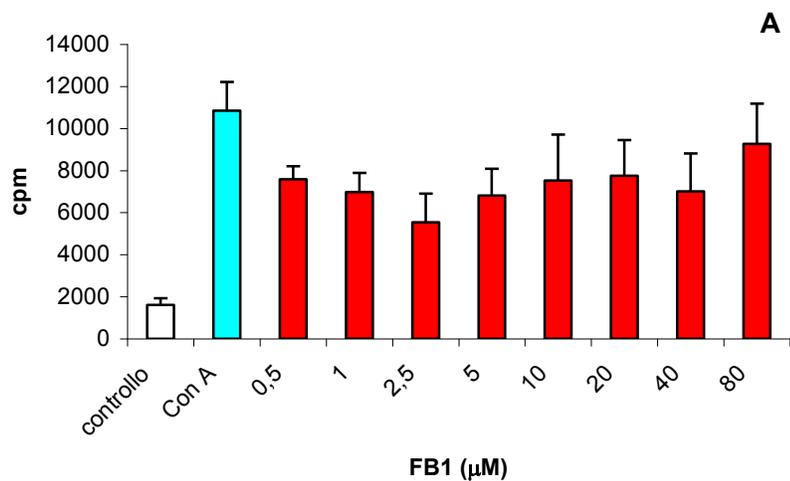


Figura 6. Effetti di FB₁ e α-ZEA sulla proliferazione di linfociti di suino. I campioni di sangue intero diluito con il mezzo di coltura RPMI 1640 (100 µl) sono stati piastrati in multiwell da 96 pozzetti ed incubati in presenza concentrazioni crescenti di FB₁ (A) e α-ZEA (B) singolarmente per 24 ore. L'incorporazione di [³H]-timidina nel DNA neosintetizzato è stata utilizzata come indice di proliferazione cellulare. I risultati sono espressi come conte per minuto (cpm); ciascun valore rappresenta la media di almeno tre esperimenti indipendenti.
*P<0.05; **P<0.01.

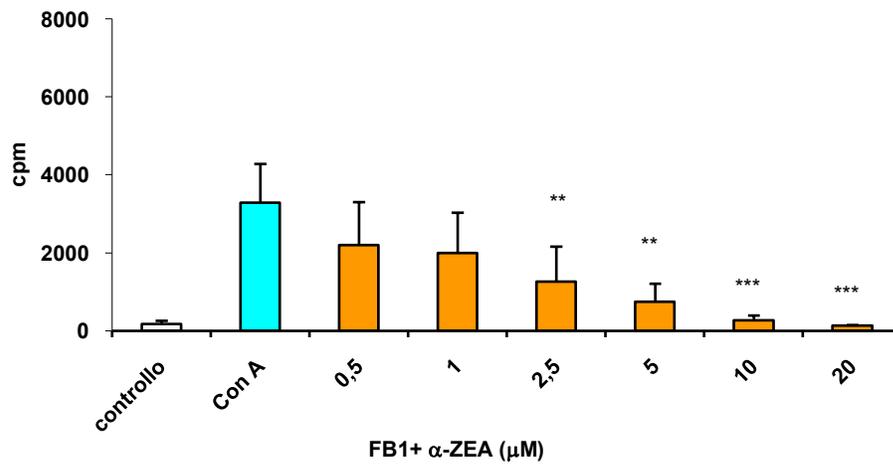


Figura 7. Effetti della combinazione $FB_1 + \alpha\text{-ZEA}$ sulla proliferazione di linfociti di suino. I campioni di sangue intero diluito con il mezzo di coltura RPMI 1640 (100 μl) sono stati piastrati in multiwell da 96 pozzetti ed incubati in presenza concentrazioni crescenti di FB_1 e $\alpha\text{-ZEA}$ contemporaneamente per 24 ore. L'incorporazione di $[^3\text{H}]$ -timidina nel DNA neosintetizzato è stata utilizzata come indice di proliferazione cellulare. I risultati sono espressi come conte per minuto (cpm); ciascun valore rappresenta la media di almeno tre esperimenti indipendenti.
 ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

4.2 EFFETTI DI NIV E DON SULLA PROLIFERAZIONE DI LINFOCITI DA SANGUE INTERO DI SUINO

In figura 8 sono riportati i risultati ottenuti in seguito all'incubazione dei campioni di sangue con i due tricoteceni singolarmente per 24 ore. I risultati dell'incubazione in presenza delle micotossine per 48 e 72 ore hanno evidenziato un andamento simile a quello osservato a 24 ore (dati non mostrati); pertanto, è stato scelto quest'ultimo come periodo di esposizione ottimale per la valutazione degli effetti dei due tricoteceni, singolarmente e in combinazione. La figura 8A mostra che il trattamento dei linfociti con concentrazioni crescenti di NIV (0.0625-2 μ M) per 24 ore induce una forte inibizione della proliferazione cellulare che risulta essere dose-dipendente e statisticamente significativa già alla concentrazione più bassa utilizzata. Anche l'incubazione con DON per 24 ore determina uno spiccato effetto inibitorio sulla proliferazione che risulta, tuttavia, essere meno accentuato rispetto a quello indotto da NIV alle stesse concentrazioni (figura 8B).

È stato successivamente valutato l'effetto della co-incubazione di NIV + DON (rapporto 1:1) sulla proliferazione di linfociti di suino. In figura 9, sono illustrati i risultati ottenuti in seguito al trattamento dei campioni di sangue con concentrazioni crescenti della combinazione dei due tricoteceni in un *range* compreso tra 0,0625 ed 1 μ M per 24 ore. Come si può notare le due micotossine, anche associate, inibiscono in maniera significativa la proliferazione cellulare.

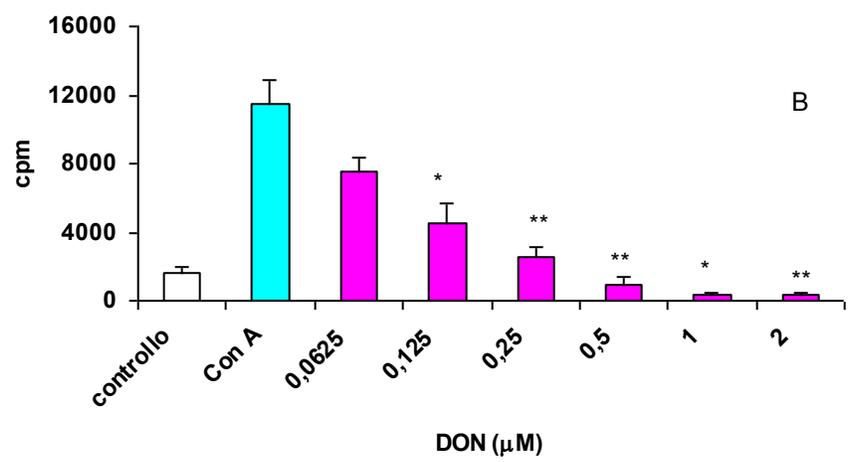
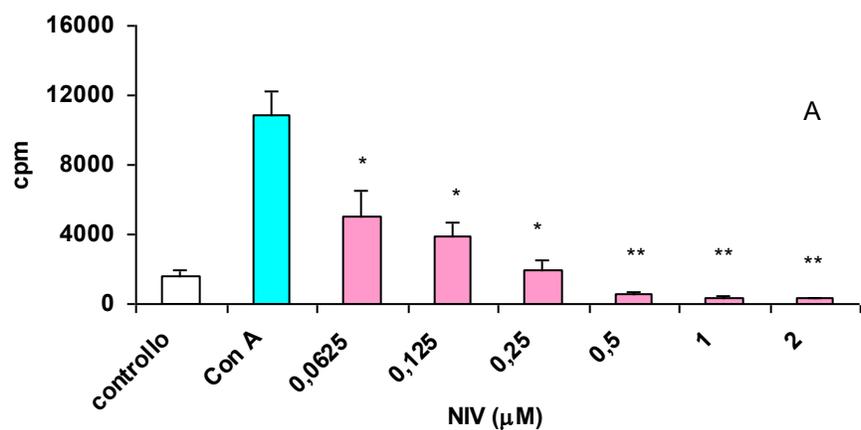


Figura 8. Effetti di NIV e DON sulla proliferazione di linfociti di suino. I campioni di sangue intero diluito con il mezzo di coltura RPMI 1640 (100 µl) sono stati piastrati in multiwell da 96 pozzetti ed incubati in presenza concentrazioni crescenti di NIV (A) e DON (B) singolarmente per 24 ore. L'incorporazione di [³H]-timidina nel DNA neosintetizzato è stata utilizzata come indice di proliferazione cellulare. I risultati sono espressi come conte per minuto (cpm); ciascun valore rappresenta la media di almeno tre esperimenti indipendenti.
*P<0.05; **P<0.01.

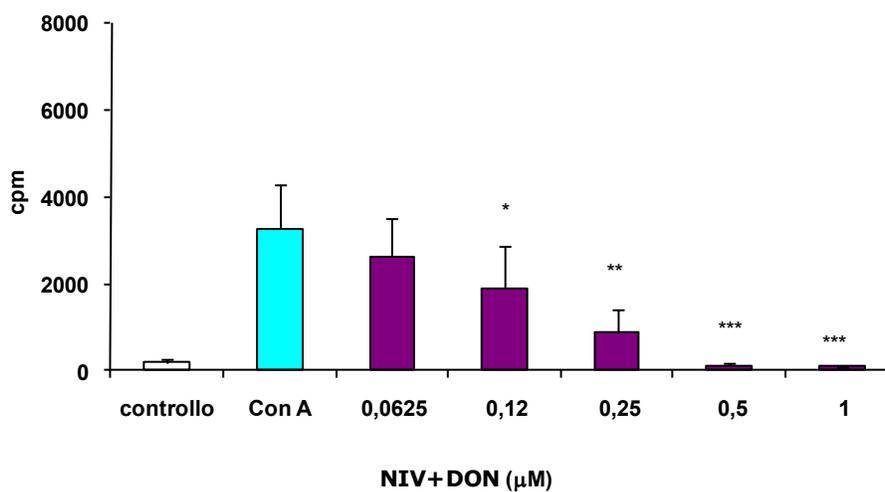


Figura 9. Effetti della combinazione NIV+DON sulla proliferazione di linfociti di suino. I campioni di sangue intero diluito con mezzo di coltura RPMI 1640 (100 μl) sono stati piastrati in multiwell da 96 pozzetti ed incubati in presenza concentrazioni crescenti di NIV e DON contemporaneamente per 24 ore. L'incorporazione di [³H]-timidina nel DNA neosintetizzato è stata utilizzata come indice di proliferazione cellulare. I risultati sono espressi come conte per minuto (cpm); ciascun valore rappresenta la media di almeno tre esperimenti indipendenti.
 P<0.01; *P<0.001.

4.3 EFFETTI DI NIV, DON, AFB₁, AFB₂, AFM₁ E AFM₂ SULLA VITALITÀ DI CELLULE J774A.1

Cellule J774A.1 sono state incubate per 24, 48 e 72 ore in presenza di concentrazioni crescenti delle micotossine NIV e DON, da sole e in combinazione (10-100 μ M), AFB₁, AFB₂, AFM₁ e AFM₂, singolarmente e diversamente combinate tra loro (0.05-50 μ M), come già precedentemente indicato. È stata determinata la vitalità cellulare mediante il saggio con MTT. Come controllo sono state utilizzate cellule non esposte alle micotossine la cui vitalità è stata considerata come 100%. I risultati sono stati espressi come la concentrazione di micotossina capace di ridurre la vitalità cellulare del 50% (IC₅₀). Come mostrato nella tabella 1, è stato osservato un significativo effetto anti-proliferativo già a 24 ore sia per NIV che per DON (sembra che non si verificano interazioni di tipo sinergico e/o additivo sulla vitalità delle cellule J774A.1 alle concentrazioni analizzate). Inoltre, i risultati mostrano che nessuna delle aflatossine testate manifesta attività citotossica/antiproliferativa rilevabile dopo 24 ore di incubazione.

L'AFB₁ risulta la più citotossica dopo 48 ore di incubazione con una IC₅₀ di 55.77 \pm 4,2 μ M; nessuna differenza significativa risulta rilevabile con AFB₂. Inoltre, la combinazione di AFB₁ con il corrispondente metabolita AFM₁ riduce il potenziale citotossico/antiproliferativo della singola AFB₁.

Micotossina	IC ₅₀ [μM]		
	24 h	48 h	72 h
DON	23.3 ± 2.0	15.9 ± 0.3	16.8 ± 0.2
NIV	5.8 ± 0.9 ^{°°}	10.5 ± 0.6 [°]	11.2 ± 0.8 ^{°°}
DON+NIV	15.0 ± 3.0	14.4 ± 1.5	14.0 ± 1.9
AFM₁	n.d.	n.d.	n.d.
AFM₂	n.d.	n.d.	n.d.
AFM₁+AFM₂	n.d.	n.d.	n.d.
AFB₁	n.d.	55.77 ± 4.2	47.29 ± 0.9
AFB₂	n.d.	n.d.	n.d.
AFB₁+AFB₂	n.d.	49.52 ± 3.2	42.2 ± 3.4
AFM₁+AFB₁	n.d.	93.24 ± 1.3	74.25 ± 0.9
AFM₂+AFB₂	n.d.	n.d.	n.d.

Tabella 1. Effetto antiproliferativo delle micotossine DON, NIV, AFB₁, AFB₂, AFM₁, AFM₂, singolarmente e diversamente combinate tra loro, sulla vitalità di macrofagi murini J774A.1. La vitalità delle cellule di controllo è stata designata come il 100% ed i risultati sono stati espressi come la concentrazione di aflatossina in grado di ridurre la vitalità cellulare del 50% (IC₅₀). I risultati sono espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti.

^{°°}P < 0.01 NIV vs DON; [°]P < 0.05 NIV vs DON

4.4 EFFETTI DI AFB₁, AFB₂, AFM₁ E AFM₂, SULL'ATTIVAZIONE DI CELLULE J774A.1

L'attivazione dei macrofagi J774A.1 è stata analizzata mediante il reattivo di Greiss valutando il rilascio di NO₂⁻ nel mezzo di coltura in seguito al trattamento delle cellule con concentrazioni crescenti di AFM₁, AFM₂, AFB₁, AFB₂, singolarmente e diversamente combinate tra loro (AFM₁+AFM₂, AFB₁+AFB₂, AFM₁+AFB₁, AFM₂+AFB₂) per 24 ore, e stimolate poi con LPS (1 µg/ml) per ulteriori 24 ore. Come illustrato nei grafici riportati in figura 10, sia AFM₁ che AFM₂ singolarmente riducono la produzione di nitriti in cellule J774A.1 stimolate con LPS soltanto alla più alta concentrazione testata pari a 32 µM (P<0.001). Tuttavia, esse inibiscono la produzione di nitriti anche alle concentrazioni più basse (16 e 4 µM) quando somministrate contemporaneamente (figura 11).

Le AFB₁ e AFB₂ si sono dimostrate capaci di inibire in maniera significativa la produzione di nitriti alla concentrazione più elevata pari a 32 µM (figura 12); tuttavia, esse sia quando testate contemporaneamente (figura 13) sia quando associate ai loro metaboliti idrossilati (figura 14) inibiscono la produzione di nitriti in maniera significativa non soltanto alla concentrazione più elevata ma anche alle concentrazioni più basse.

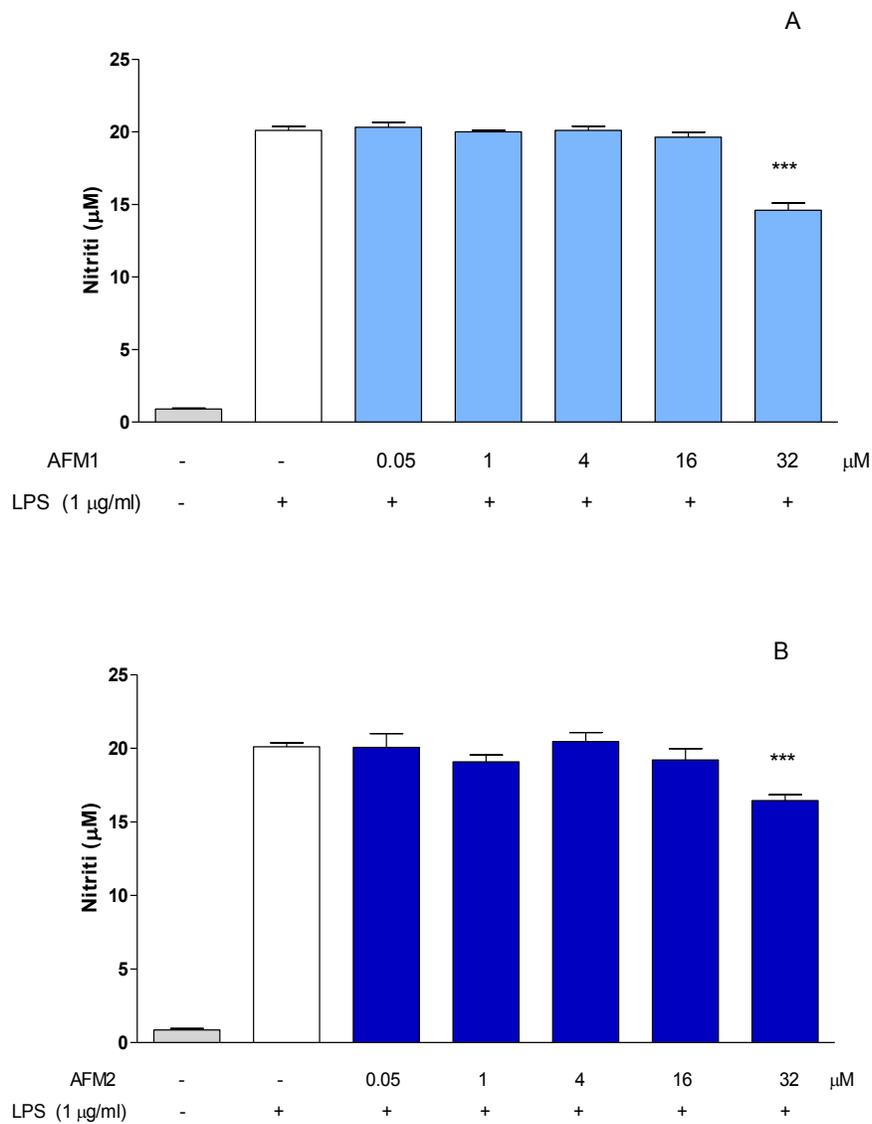


Figura 10. Effetto di AFM₁ (A) e AFM₂ (B) sulla produzione di nitriti. Macrofagi murini J774A.1 sono stati incubati in presenza di concentrazioni crescenti delle singole aflatossine per 24 ore e poi stimolati con LPS (1 µg/ml) per ulteriori 24 ore. La produzione di nitriti nel mezzo di coltura è stata valutata mediante il reattivo di Greiss.

***P<0.001 vs LPS

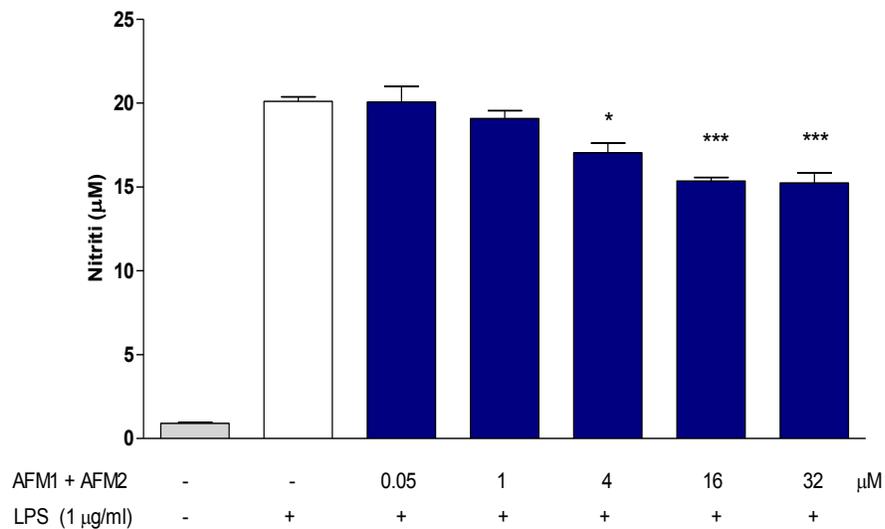


Figura 11. Effetto della combinazione di AFM₁ e AFM₂ sulla produzione di nitriti. Macrofagi murini J774A.1 sono stati incubati in presenza di concentrazioni crescenti di entrambe le aflatossine simultaneamente per 24 ore e poi stimolati con LPS (1 µg/ml) per ulteriori 24 ore. La produzione di nitriti nel mezzo di coltura è stata valutata mediante il reattivo di Greiss.

* P<0,05 vs LPS; ***P<0,001 vs LPS.

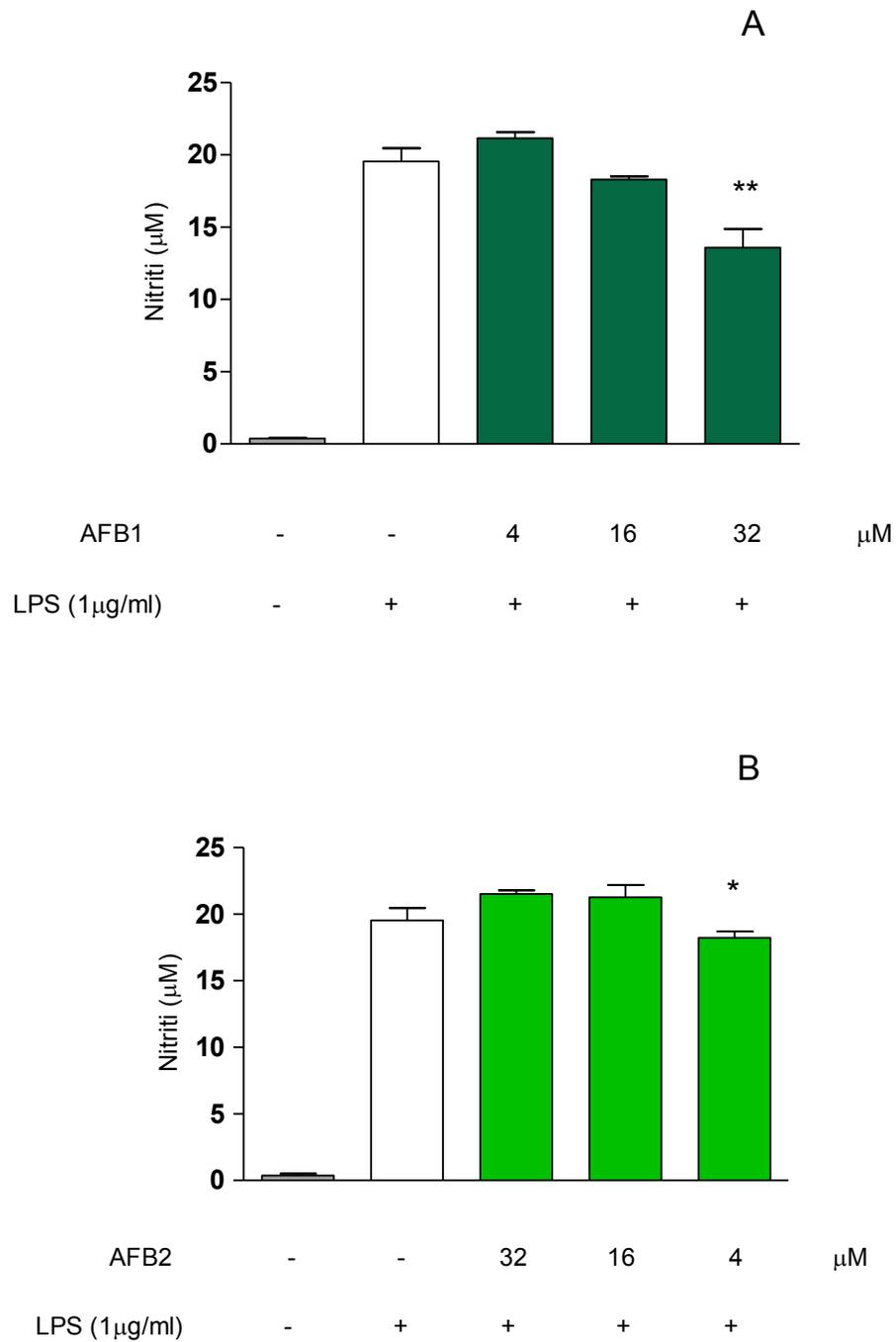


Figura 12. Effetto di AFB₁ (A) e AFB₂ (B) sulla produzione di nitriti. Macrofagi murini J774A.1 sono stati incubati in presenza di concentrazioni crescenti delle singole aflatossine per 24 ore e poi stimolati con LPS (1 µg/ml) per ulteriori 24 ore. La produzione di nitriti nel mezzo di coltura è stata valutata mediante il reattivo di Greiss. * P<0,05 vs LPS; **P<0.01 vs LPS.

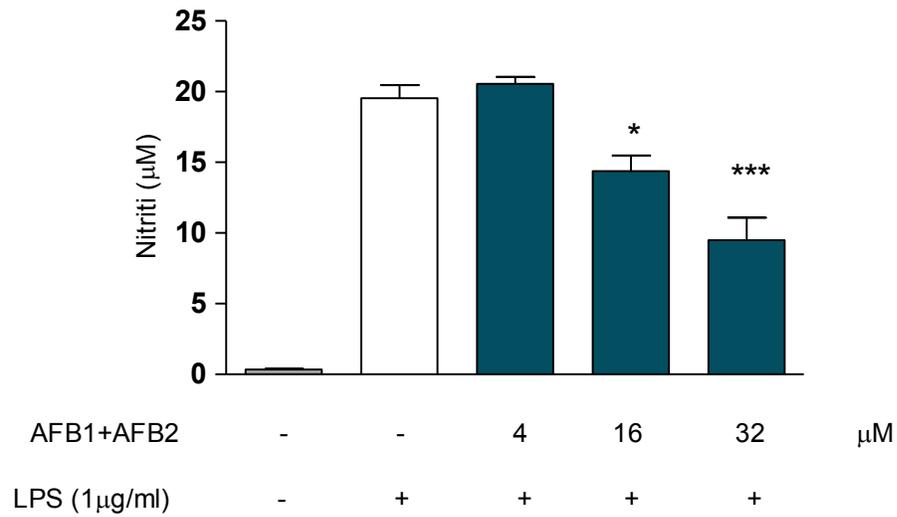


Figura 13. Effetto della combinazione di AFB₁ e AFB₂ sulla produzione di nitriti. Macrofagi murini J774A.1 sono stati incubati in presenza di concentrazioni crescenti di entrambe le aflatossine simultaneamente per 24 ore e poi stimolati con LPS (1 µg/ml) per ulteriori 24 ore. La produzione di nitriti nel mezzo di coltura è stata valutata mediante il reattivo di Greiss.
 * P<0,05 vs LPS; *** P<0,001 vs LPS.

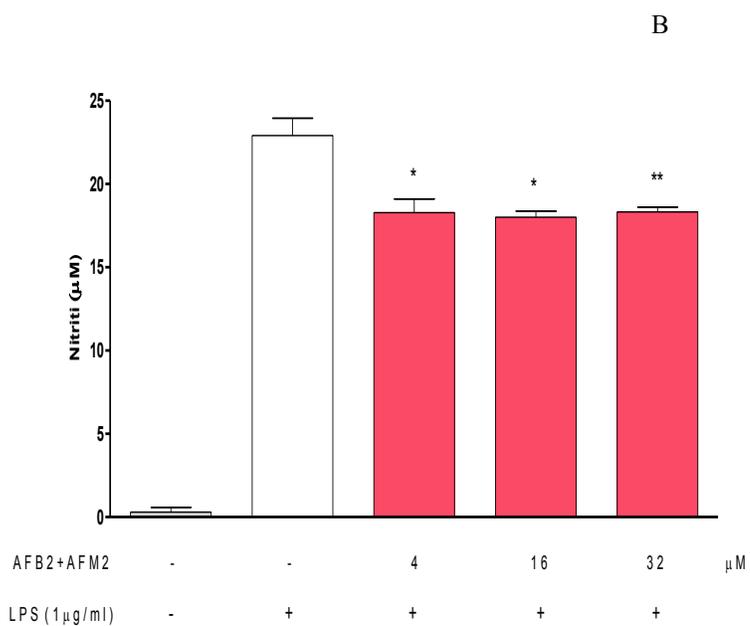
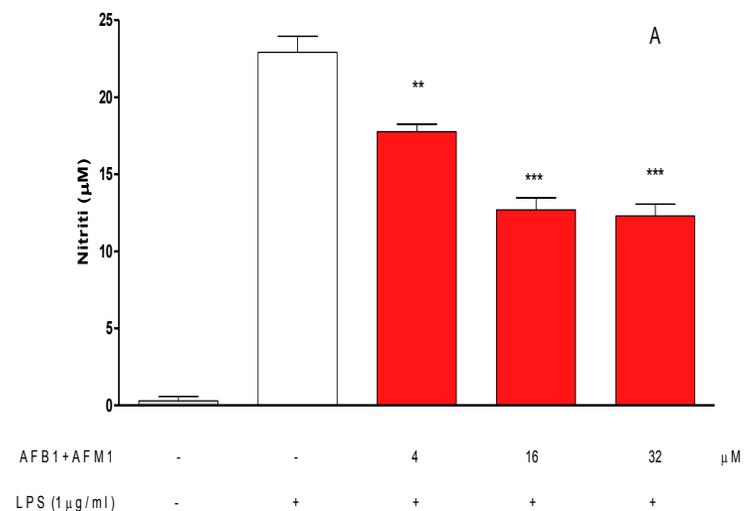


Figura 14. Effetto delle combinazioni di AFB₁+AFM₁ (A) e AFB₂+AFM₂ (B) sulla produzione di nitriti. Macrofagi murini J774A.1 sono stati incubati in presenza di concentrazioni crescenti dei composti *parent* e dei metaboliti contemporaneamente per 24 ore e poi stimolati con LPS (1 µg/ml) per ulteriori 24 ore. La produzione di nitriti nel mezzo di coltura è stata valutata mediante il reattivo di Greiss. *P<0.05 vs LPS; **P<0.01 vs LPS; *** P<0,001 vs LPS.

4.5 EFFETTI DI NIV, DON, AFB₁ E AFB₂ SULL'INDUZIONE DELL'APOPTOSI IN CELLULE J774A.1

Al fine di valutare il meccanismo alla base dell'effetto anti-proliferativo osservato nei macrofagi J774A.1 esposti a concentrazioni crescenti di NIV, DON, AFB₁ ed AFB₂, da sole e in combinazione, è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica sui nuclei ipodiploidi in seguito a colorazione con ioduro di propidio (figura 15). I nostri risultati indicano che sia NIV che DON esercitano un effetto induttivo sull'apoptosi di macrofagi J774A.1 in maniera concentrazione dipendente a tutte le concentrazioni testate ($P < 0.001$). È stato inoltre interessante notare che NIV mostra un'attività proapoptotica, alle concentrazioni di 25 e 50 μM significativamente superiore a DON ($P < 0.01$ vs DON). Nessuna interazione tuttavia è stata osservata tra NIV e DON per quanto riguarda l'induzione dell'apoptosi cellulare (dati non riportati). L'analisi citofluorimetrica effettuata sulle cellule esposte ad AFB₁ ed AFB₂ ha mostrato che entrambe le aflatossine sia da sole che in associazione non stimolano l'apoptosi cellulare (figura 16).

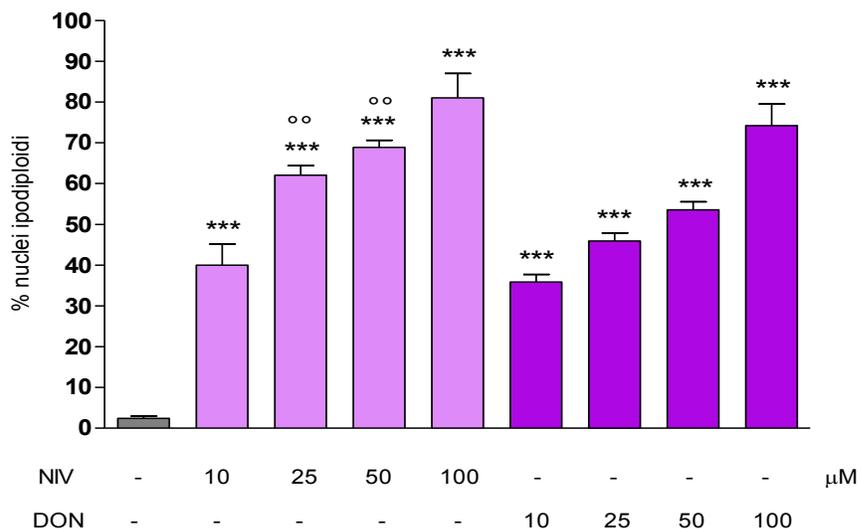


Figura 15. Attività proapoptotica di NIV e DON espressa come percentuale di nuclei ipodiploidi valutata mediante analisi citofluorimetrica con ioduro di propidio (PI). I macrofagi murini J774A.1 sono stati incubati con NIV e DON (10-100 μM) per 24 h. I risultati ottenuti sono stati espressi come media \pm SEM di tre esperimenti indipendenti. *** $P < 0.001$ vs controllo; ° $P < 0.01$ NIV vs DON.

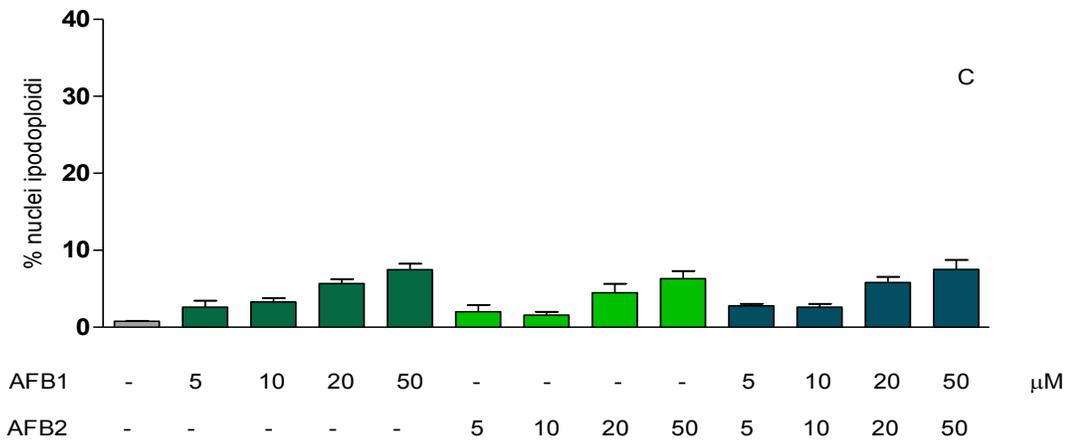
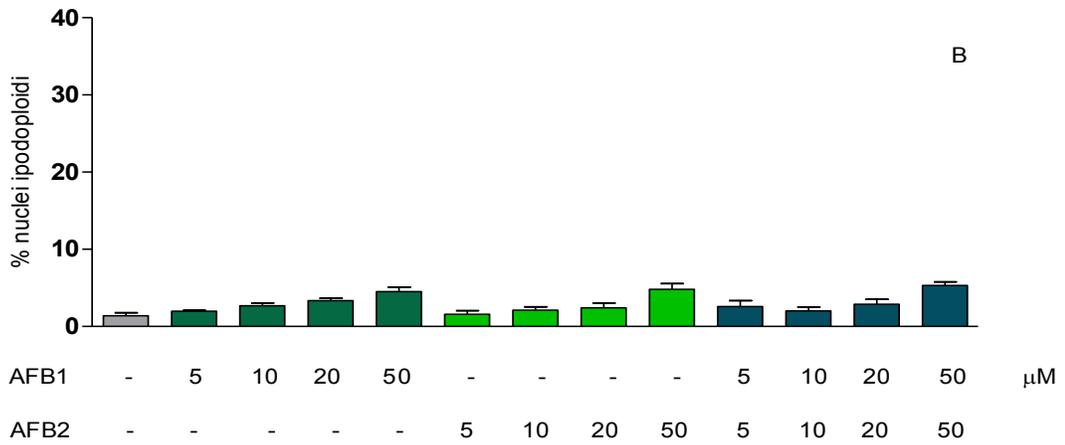
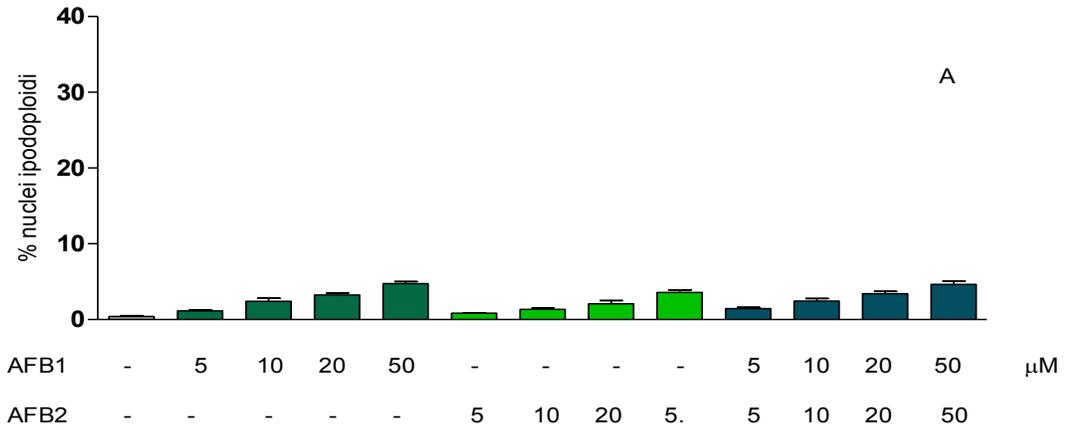


Figura 16. Attività proapoptotica di AFB₁ ed AFB₂, singolarmente e in combinazione, espressa come percentuale di nuclei ipodiploidi mediante analisi citofluorimetrica con ioduro di propidio (PI). I macrofagi murini J774A.1 sono stati incubati con AFB₁ ed AFB₂, singolarmente e in combinazione (5-50 μM) per 24 (A), 48 (B) e 72 (C) ore.

4.6 EFFETTI DI NIV, DON, AFB₁ E AFB₂ SUL CICLO CELLULARE IN CELLULE J774A.1

Al fine di verificare se le micotossine NIV, DON, AFB₁ ed AFB₂ sono in grado anche di influenzare il ciclo cellulare di macrofagi J774A.1, è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica sulle cellule trattate con le micotossine, singolarmente o in combinazione, per 24 e/o 48 e/o 72 ore. Come mostrato in figura 17, l'esposizione dei macrofagi ad entrambi i tricoteceni per 24 ore ha comportato un significativo aumento della popolazione di cellule in G₀/G₁ (DON: P <0.001; NIV: P<0.01) accompagnato da una significativa riduzione di cellule in fase S (DON: P<0.001; NIV: P<0.01). Relativamente alle aflatossine (figura 18), l'analisi citofluorimetrica ha evidenziato una significativa diminuzione del numero di cellule in fase G₀/G₁ (P<0.05) quando le cellule sono state esposte ad AFB₁ da sola ed associata ad AFB₂ ed un incremento significativo (P<0.01) di cellule in fase S in seguito ad incubazione con la sola AFB₁; tale effetto è risultato significativo soltanto alla concentrazione più elevata (50 µM).

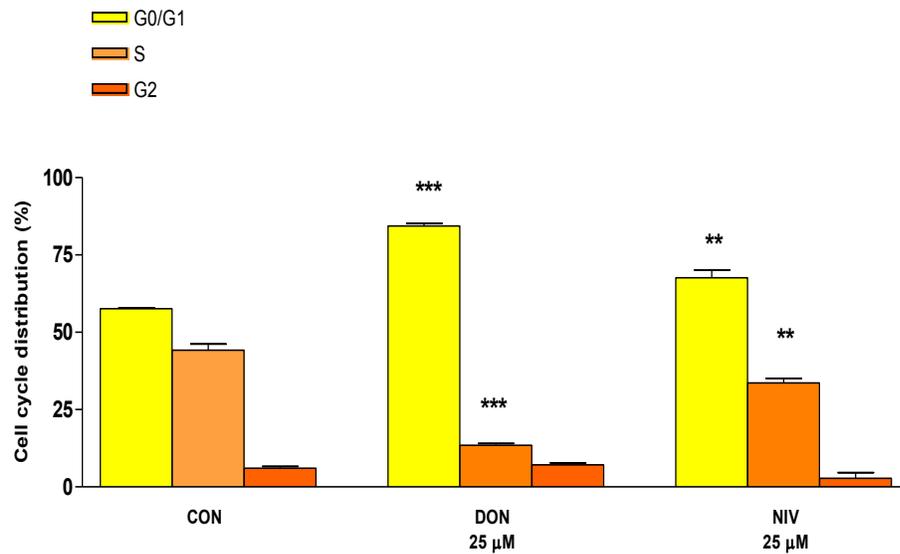


Figura 17. Distribuzione percentuale di cellule J774A.1 nelle diverse fasi del ciclo cellulare. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata su cellule esposte a NIV e DON (25 μM) per 24 ore ed incubate con ioduro di propidio. I risultati ottenuti sono stati espressi come media ± SEM di tre esperimenti indipendenti. **P<0.01 vs CON; *** P<0.001vs CON.

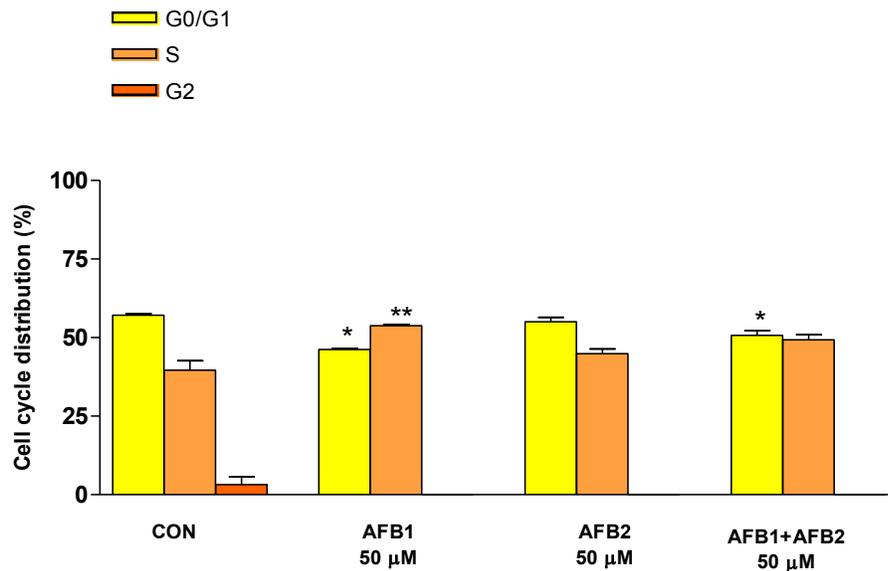


Figura 18. Distribuzione percentuale di cellule J774A.1 nelle diverse fasi del ciclo cellulare. L'analisi citofluorimetrica è stata effettuata su cellule esposte a AFB₁ ed AFB₂ (50 μM), singolarmente ed in combinazione, per 24 ore ed incubate con ioduro di propidio. I risultati ottenuti sono stati espressi come media ± SEM di tre esperimenti indipendenti. *P<0.05 vs CON; ** P<0.01vs CON.

4.7 EFFETTI DI NIV E DON SULL'ESPRESSIONE DI *p*-ERK E BAX IN CELLULE J774A.1

Al fine di esaminare i meccanismi che mediano i processi apoptotici osservati nel corso degli esperimenti precedenti, sono stati valutati i livelli di espressione delle proteine ERK e Bax, entrambe implicate nel fenomeno dell'apoptosi cellulare, in macrofagi J774A.1 incubati in presenza di NIV e DON (25 μ M) mediante la tecnica del Western blot.

L'espressione di *p*-ERK è stata valutata nei macrofagi incubati in presenza dei tricoteceni per 15, 30 e 60 minuti; i livelli di *p*-ERK sono risultati significativamente elevati già a 15 minuti indicando una rapida attivazione della MAPK ERK da parte di NIV; entrambi i tricoteceni, tuttavia, provocano l'attivazione della proteina ERK in maniera significativa dopo 30 e 60 minuti di incubazione (figura 19).

Successivamente abbiamo esaminato la capacità di NIV e DON di indurre l'attivazione Bax, una delle principali proteine proapoptotiche. I macrofagi J774A.1 sono stati incubati in presenza di NIV e DON (25 μ M) per 8 e 24 ore. Come mostrato in figura 20, entrambe le micotossine sono risultate capaci di indurre in maniera significativa l'espressione della proteina Bax già dopo 8 ore di incubazione.

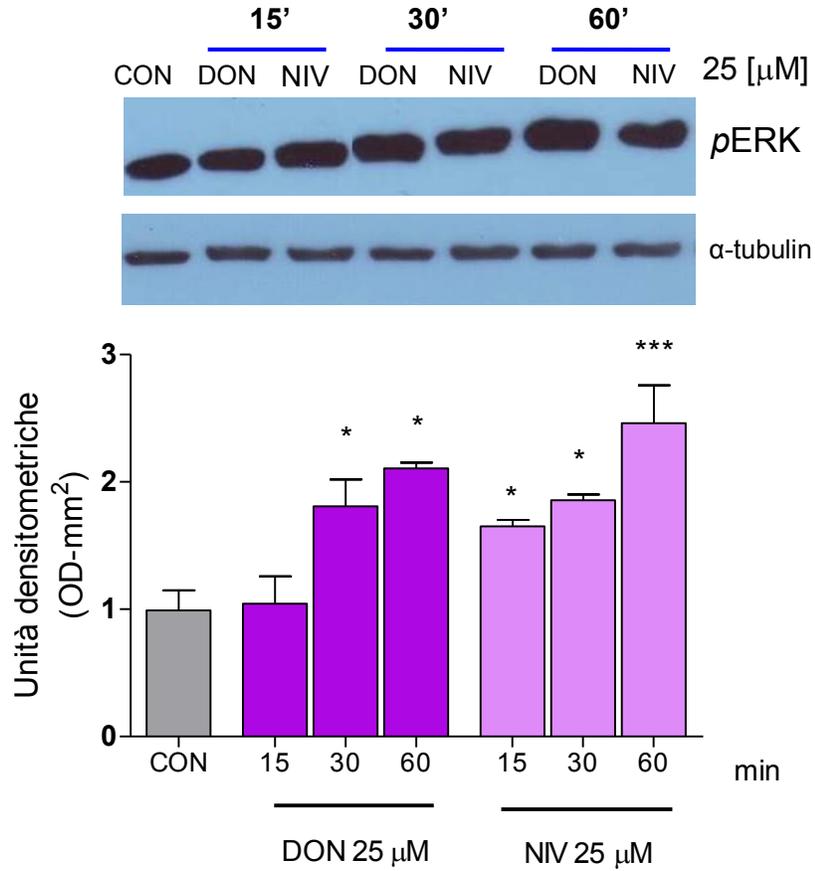


Figura 19. Effetto di NIV e DON sull'espressione di pERK. Macrofagi J774A.1 sono stati esposti ai due tricoteceni per 15, 30 e 60 minuti. I livelli di espressione della forma attivata della proteina ERK sono stati rilevati mediante Western blot. La tubulina è stata utilizzata come controllo. *P<0.05 vs CON; ***P<0.001 vs CON.

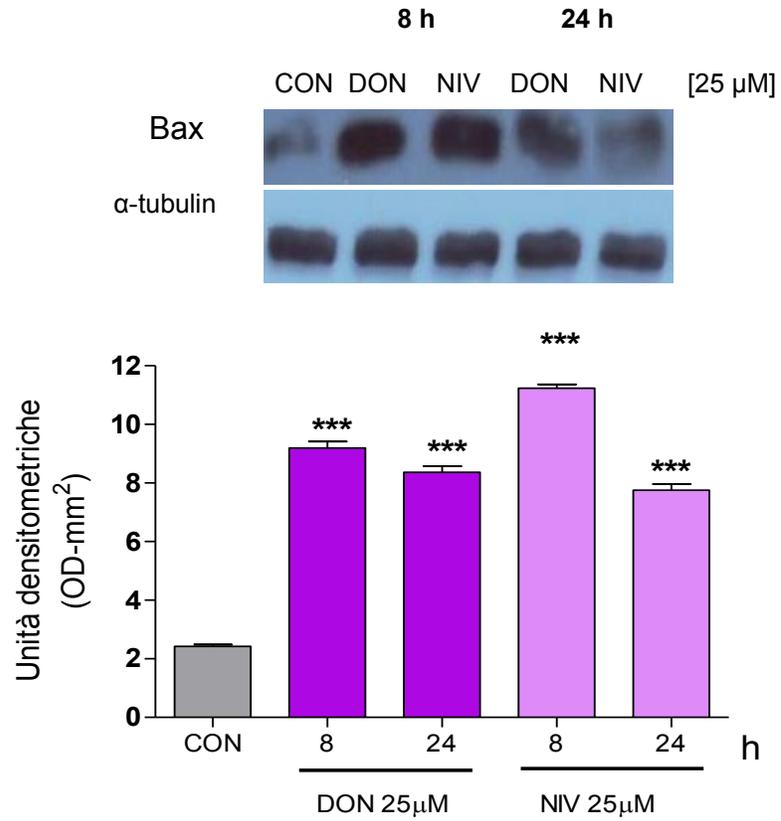


Figura 20. Effetto di NIV e DON sull'espressione della proteina proapoptica Bax. Macrofagi J774A.1 sono stati esposti ai due tricoteceni NIV e DON per 8 e 24 ore. I livelli di espressione della proteina Bax sono stati rilevati mediante Western blot. La tubulina è stata utilizzata come controllo. *** $P < 0.001$ vs CON.

4.8 EFFETTI DI NIV E DON SULL'ATTIVAZIONE DI CASPASI-3 E PARP-1 IN CELLULE J774A.1

Al fine di esaminare i meccanismi che mediano i processi apoptotici osservati nel corso degli esperimenti precedenti, sono stati valutati i livelli di espressione delle proteine caspasi-3 e PARP-1, entrambe implicate a valle nella cascata di eventi molecolari che culmina del fenomeno di apoptosi cellulare, in macrofagi J774A.1 incubati in presenza di NIV e DON (25 μ M) mediante la tecnica del Western blot. Come mostrato in figura 21, sia NIV che DON (25 μ M) sono capaci di indurre l'attivazione della procaspasi-3 in caspasi-3, in funzione del tempo. L'espressione della caspasi-3 nei macrofagi J774A.1, evidente già dopo 8 ore di incubazione, raggiunge il massimo dopo 24 ore di incubazione in presenza di ciascuna micotossina.

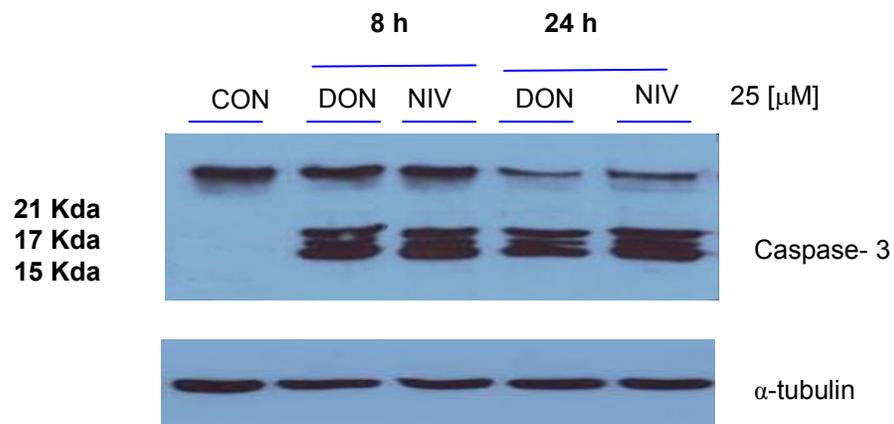


Figura 21. Effetto di NIV e DON sull'espressione della caspasi-3. Macrofagi J774A.1 sono stati esposti ai due tricoteceni per 8 e 24 ore. I livelli di espressione della caspasi-3 sono stati rilevati mediante Western blot. La tubulina è stata utilizzata come controllo.

Infine, per analizzare gli effetti di NIV e DON sulle funzioni di riparazione del DNA, abbiamo valutato i livelli di espressione della proteina PARP-1 nei macrofagi J774A.1 esposti ai due tricoteceni (25 μ M) per 24 ore. I nostri risultati hanno mostrato che sia NIV che DON sono in grado di provocare un significativo incremento dei livelli della forma clivata della proteina PARP-1 (figura 22); quest'ultima è risultata maggiormente espressa nei macrofagi esposti a NIV ($P < 0.05$ NIV vs DON).

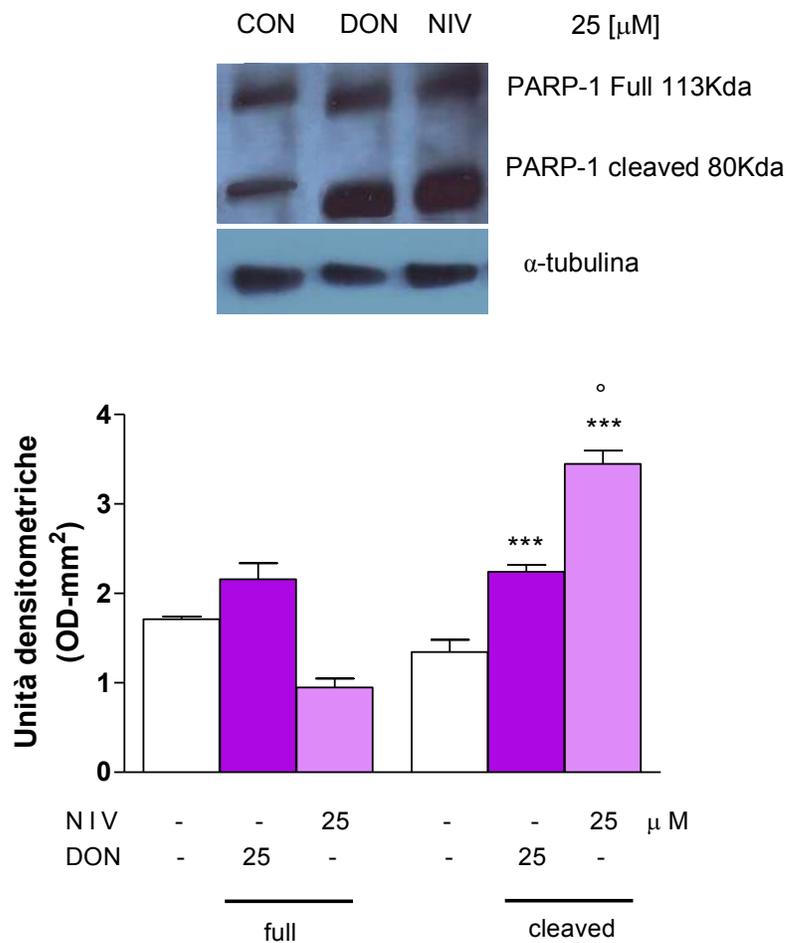


Figura 22. Effetto di NIV e DON sull'espressione di PARP-1. Macrofagi J774A.1 sono stati esposti ai due tricoteceni per 24 ore. I livelli di espressione di PARP-1 sono stati rilevati mediante Western blot. La tubulina è stata utilizzata come controllo. *** $P < 0.001$ vs CON; ° $P < 0.05$ NIV vs DON.

5. DISCUSSIONE

La crescente contaminazione di alimenti e mangimi ed i rischi sanitari derivanti dall'impatto di tali contaminanti naturali su uomo e animali confermano l'attualità di tali studi sottolineando al contempo l'importanza di una più attenta valutazione tossicologica delle micotossine. Come già accennato, l'esposizione dell'uomo a tali xenobiotici si verifica principalmente attraverso il consumo di alimenti di origine vegetale; tuttavia, anche la presenza di micotossine in alcuni prodotti di origine animale, per il fenomeno di *carry over*, può rappresentare un rischio per la salute pubblica. Si consideri, inoltre, che i prodotti alimentari destinati al consumo umano ed animale risultano spesso contaminati da più di una micotossina (Sangare-Tigori et al., 2006; Speijers and Speijers, 2004).

Tra i vari organi ed apparati che risentono degli effetti tossici delle micotossine oggetto del presente studio, il sistema immunitario risulta particolarmente sensibile; gli effetti immunotossici, infatti, si manifestano a concentrazioni molto basse, inferiori a quelle in grado di provocare gli effetti clinici di micotossicosi. Il sistema immunitario rappresenta un importante organo bersaglio di molti xenobiotici che possono provocare effetti indesiderati quali immunosoppressione, proliferazione incontrollata, alterazioni nei meccanismi di difesa verso patogeni e cellule tumorali, allergia ed autoimmunità. In particolare, nei mammiferi è stato osservato che sia l'immunità cellulo-mediata che quella umorale possono essere depresse da contaminanti ambientali tra cui diverse micotossine (Xue et al., 2010; Ferrari et al., 2009; Kubosaki et al., 2008; Marin et al., 2007; Oswald et al., 2005; Campbell et al., 2004; Hinton et al., 2003; Bondy and Pestka, 2000; Sharma, 1993).

Nella presente ricerca, allo scopo di valutare l'attività immunomodulatoria di fumonisina B₁, α -zearalenolo, deossinivalenolo, nivalenolo, aflatossina B₁, aflatossina B₂, aflatossina M₁ ed aflatossina M₂ sono stati utilizzati due modelli sperimentali di cellule immuno-competenti: linfociti da sangue di suino in coltura primaria e macrofagi murini (cellule J774A.1).

Il primo obiettivo è stato quello di valutare gli effetti di differenti micotossine sulla proliferazione di **linfociti da sangue di suino in coltura primaria**. La scelta di tale modello è motivata principalmente dalla particolare sensibilità di tale specie verso le micotossine oggetto del presente studio. Inoltre, più recentemente alcuni Autori hanno evidenziato l'esistenza di un'elevata correlazione tra i risultati ottenuti esponendo PBMC di suino e quelli ottenuti esponendo linfociti di uomo a differenti micotossine (Taranu et al., 2010). Sotto un profilo strettamente metodologico, la scelta di utilizzare i linfociti da sangue intero piuttosto che isolati mediante gradiente, è stata dettata dalla considerazione che tale coltura rappresenta un modello *in vitro* che può meglio approssimare gli eventi che accadono *in vivo*, in particolare le interazioni tra le diverse popolazioni cellulari, da cui deriva la capacità di elaborare e secernere le citochine nella risposta finale. Tale metodica presenta anche il vantaggio di eliminare gli artefatti insiti alle procedure di isolamento e centrifugazione che possono compromettere la vitalità cellulare (Damsgaard et al., 2009) e, allo stesso tempo, risulta meno dispendiosa sia in termini di costi che di tempi rispetto a quella dei linfociti isolati.

Negli ultimi anni, il ricorso a modelli cellulari negli studi tossicologici è aumentato notevolmente al fine di limitare l'utilizzo di animali da laboratorio sia in ragione dei costi elevati che comportano gli studi *in vivo* sia per motivi di ordine etico; gli studi *in vitro*, inoltre, offrono la possibilità di poter studiare gli effetti e di caratterizzare il meccanismo d'azione di sostanze differenti a concentrazioni molto ridotte. In particolare, l'utilizzo di sangue intero per studi di immunobiologia sembra aver acquisito notevole rilevanza scientifica (Lankveld et al., 2010); numerosi risultano in letteratura gli studi in cui si è fatto ricorso a tale modello sperimentale, ad esempio, per la valutazione della produzione di citochine quale indicatore di immunotossicità in seguito ad esposizione a xenobiotici di diversa natura (Stoddard et al., 2010; Damsgaard et al., 2009; Thrum and Halsey, 2005; Langezaal et al., 2001). Come evidenziato dai risultati della presente ricerca ed in accordo con altri Autori, il sangue intero può rappresentare un valido modello anche per lo studio degli effetti immunotossici delle micotossine (Pinton et al., 2008; Sokolovic et al., 2007; Keblyns et al., 2004; Richetti et al., 2003). I risultati da noi ottenuti incubando i linfociti di suino

in presenza delle quattro fusariotossine prese in esame dimostrano che tre di esse, α -ZEA, DON e NIV, causano inibizione della proliferazione cellulare a concentrazioni molto basse (Luongo et al., 2008) in accordo sia con nostri precedenti lavori condotti utilizzando cellule Jurkat quale modello di linfocita T (Luongo et al., 2006; Severino et al., 2006) sia con altri studi presenti in letteratura (Girish et al., 2010; Mikami et al., 2010; Nasri et al., 2006). La FB₁, al contrario, sembra non alterare in maniera significativa la proliferazione linfocitaria nel nostro modello cellulare in accordo con quanto riscontrato da altri Autori in PBMC di suino (Taranu et al., 2010), di uomo (Meky et al., 2001), in linfociti di pollo (Keck and Bodine, 2006) e di ratto (Theumer et al., 2002). Le differenti concentrazioni di micotossina utilizzate nei diversi modelli cellulari può essere spiegata considerando che le cellule in coltura primaria risultano in generale molto più sensibili a simili trattamenti rispetto a cellule trasformate in coltura continua; in seconda istanza va sottolineato che il suino rappresenta la specie domestica maggiormente sensibile agli effetti tossici delle fusariotossine oggetto del presente studio.

Differenti modelli cellulari umani e animali sono stati ampiamente utilizzati per studiare gli effetti tossici delle micotossine sul sistema immunitario. È stato dimostrato che i macrofagi rappresentano cellule particolarmente sensibili a tali composti (Bae and Pestka, 2008; Pestka, 2008; Zhou et al., 2005; Theumer et al., 2003; Moon et al., 2002; Sugita-Konishi and Pestka, 2001). L'utilizzo di **macrofagi murini J774A.1** come secondo modello cellulare è dovuto al fatto che i macrofagi costituiscono un'importante componente del sistema immunitario di uomo ed animali; essi, infatti, sono responsabili dell'immunità innata innescando le risposte di difesa dell'ospite e fagocitando i microrganismi, in particolare i batteri. Essi svolgono, inoltre, un ruolo primario non solo nell'induzione e nel mantenimento del processo infiammatorio mediante l'espressione di diverse citochine ma anche producendo ossido nitrico (NO), dotato di azione battericida, che riveste un ruolo importante nel danno e nella riparazione tissutale, nella *clearance* delle cellule apoptotiche e nella sorveglianza antineoplastica (Janeway-Travers, 1996).

I risultati del saggio dell'MTT hanno rivelato una significativa riduzione della vitalità di macrofagi murini J774A.1 trattati con concentrazioni crescenti delle due

fusariotossine, NIV e DON; l'effetto indotto da NIV è risultato maggiore rispetto a quello indotto da DON alle stesse concentrazioni in accordo con altri studi che indicano una compromissione della funzionalità in macrofagi esposti a tali micotossine (Minervini et al., 2004; Sugita-Konishi and Pestka, 2001).

Inoltre, considerando da una parte la diffusa presenza delle aflatossine in differenti derrate alimentari e dall'altra la carenza di studi relativi agli effetti che alcuni metaboliti possono indurre su cellule immunocompetenti, nella presente ricerca è stata valutata oltre all'attività immunomodulatoria di aflatossina B₁ e aflatossina B₂, anche quella dei loro metaboliti idrossilati aflatossina M₁ ed aflatossina M₂.

Per quanto riguarda la citotossicità delle aflatossine, in letteratura sono presenti dati contrastanti. È stato dimostrato che AFB₁ può compromettere la vitalità di diversi tipi cellulari; un recente studio ha evidenziato che AFB₁ risulta citotossica in cellule epiteliali di mammella di bovino (BME-UV1) con una CC₅₀ a 72 ore pari a 20.42 µM (Caruso et al., 2009). Liu et al. (2002) hanno dimostrato che l' AFB₁ riduce la vitalità di macrofagi alveolari murini del 41% rispetto al controllo in seguito ad esposizione a 1.5 µg/ml per 24 ore. Al contrario, uno studio *in vivo* ha dimostrato che la somministrazione di AFB₁ a suini per 4 settimane non ha modificato la proliferazione di linfociti in coltura stimolati con mitogeno (Meissonier et al., 2008). Moon et al. (1999) hanno riferito che AFB₁ (10-50 µM) non altera in maniera significativa la vitalità cellulare in macrofagi murini peritoneali né quella di cellule tumorali dopo 48 e 72 ore di incubazione, rispettivamente. AFB₁ e AFM₁ risultano mielotossiche riducendo la vitalità ed inibendo la maturazione dei progenitori delle cellule della linea mieloide in uomo e topo (Roda et al., 2010) e riducono la funzionalità di cellule di Kupffer, anche se l'AFM₁ è risultata meno tossica rispetto al composto *parent* (Cusumano et al., 1995). L'AFM₁, pur essendo un prodotto di detossificazione dell'AFB₁ per quanto riguarda la cancerogenicità e la genotossicità, può risultare citotossica in particolare per cellule immunocompetenti come dimostrato da Neal et al. (1998) in cellule linfoblastoidi umane (cHol) in seguito ad esposizione alla micotossina (0.5-1 µg/ml). Al contrario, l'AFM₁ (0.3-32 nM) non altera la vitalità di cellule intestinali umane (Caco-2) dopo 48 ore di incubazione (Caloni et al., 2006).

Nonostante siano reperibili in letteratura diversi studi circa l'immunotossicità di AFB₁, attualmente risultano del tutto carenti gli studi relativi agli effetti immunotossici di AFB₂ e, ancor più, quelli relativi ad AFM₁ ed AFM₂. I risultati del saggio dell'MTT ottenuti nel corso della presente ricerca hanno rilevato che mentre il composto *parent* causa una riduzione significativa della vitalità delle cellule esposte per 24, 48 e 72 ore, sia AFB₂ sia i metaboliti, AFM₁ ed AFM₂, non alterano in maniera statisticamente significativa la vitalità cellulare.

Circa la co-contaminazione degli alimenti ad opera di più micotossine, recenti studi di monitoraggio effettuati in Croazia hanno evidenziato la contemporanea presenza di zearalenone e fumonisine B₁ nel 12.5% dei campioni di mais destinato al consumo umano e nel 54% dei mangimi analizzati (Šegvic Klaric et al., 2009). Rocha et al. (2009) hanno riscontrato che il 7% dei campioni analizzati di mais prodotto in Brasile nel 2005 è risultato contaminato simultaneamente da fumonisine ed aflatossine; la stessa combinazione è stata riscontrata in campioni di mais brasiliano anche da Vargas e colleghi (2001). Tali risultati risultano concordano con quelli ottenuti in uno studio di monitoraggio effettuato su campioni di mais prodotto in Tanzania nel 2005 in cui il 10% dei campioni analizzati risultava contaminato da entrambe le micotossine contemporaneamente (Kymania et al., 2008). Inoltre, NIV e DON (Eskola et al., 2001), FB₁ e ZEA (Domijan et al., 2005) nonché AFs e ZEA (Šegvic Klaric et al., 2009) rappresentano alcune tra le varie combinazioni di micotossine riscontrate più frequentemente in Europa.

Inoltre, non va trascurato il fatto che l'uomo può essere esposto contemporaneamente a micotossine diverse e/o a loro metaboliti anche attraverso il consumo di alimenti diversi; ad esempio, può assumere AFB₁ attraverso i cereali ed AFM₁ attraverso il latte e derivati. In termini di valutazione del rischio, risulta utile lo studio delle co-contaminazioni delle derrate alimentari in quanto micotossine diverse presenti simultaneamente all'interno del medesimo substrato e/o in substrati differenti, una volta giunte nell'organismo, possono interagire dando origine ad effetti sinergici, additivi od antagonisti (Tajima et al., 2002); in particolare, lo studio dei meccanismi molecolari alla base della tossicità di tali sostanze può essere utile per capire il modo con cui esse interagiscono. Infine, tali studi possono fornire informazioni utili ai fini

legislativi nel contribuire alla definizione e/o ottimizzazione dei livelli massimi di micotossine consentiti dalla normativa in vigore negli alimenti destinati al consumo umano e nei mangimi. Nonostante il crescente interesse suscitato da tale problematica, vi sono ancora poche informazioni riguardo le interazioni tra micotossine e le conseguenze sulla salute umana ed animale.

È noto che alcune micotossine sono in grado di esercitare effetti additivi e sinergici (Tajima et al., 2002) mentre altre agiscono come antagonisti (Koshinsky e Khachatourians, 1992). I risultati di un nostro precedente studio (Luongo et al. 2006) hanno dimostrato che la contemporanea somministrazione di α -zearalenolo e fumonisina B₁ provocava un incremento dell'inibizione della proliferazione di cellule Jurkat rispetto agli effetti indotti dalle singole micotossine indicando un effetto sinergico; analogamente Theumer et al. (2003) hanno mostrato effetti immunobiologici diversi indotti dalla combinazione di aflatoxine B₁ e fumonisina B₁ rispetto a quelli causati dalle singole micotossine. Un altro studio *in vitro* condotto utilizzando micotossine prodotte da funghi appartenenti al genere *Penicillium* ha dimostrato che la maggioranza delle combinazioni analizzate dava luogo ad interazioni (Bernhoft et al., 2004). I risultati del presente studio hanno dimostrato che la co-incubazione di linfociti di suino con FB₁ ed α -ZEA causa un potenziamento dell'attività di α -ZEA; tale effetto può essere interpretato come un'interazione di tipo sinergico tra le due fusariotossine. Tali risultati concordano pienamente con quelli presenti in letteratura (Luongo et al., 2006; Cetin and Bullerman, 2005; Tajima et al., 2002). Al contrario, incubando i linfociti di suino in presenza della combinazione dei due tricoteceni, NIV e DON, non è stato osservato alcun incremento della citotossicità rispetto agli effetti indotti dalle singole micotossine. Tale risultato, pur concordando con diversi studi presenti in letteratura (Guoze et al., 2005; Groten et al., 1999), sembra non essere confermato da alcuni Autori (Minervini et al., 2004; Tajima et al., 2002; Thuvander et al., 1999). D'altronde, i tricoteceni sembrano mostrare attività differenti quando somministrati singolarmente o in combinazione come evidenziato da uno studio di Koshinski et al. (1992) in cui i due tricoteceni, T-2 e HT-2, si comportavano da antagonisti quando analizzati singolarmente mentre l'effetto diventava sinergico in presenza delle due micotossine contemporaneamente.

Nel secondo modello sperimentale utilizzato, l'incubazione di macrofagi J774A.1 con NIV e DON contemporaneamente non incrementa il potenziale anti-proliferativo delle singole micotossine; possiamo concludere, pertanto, che tra NIV e DON non si verificano interazioni nei modelli cellulari da noi utilizzati.

La combinazione di AFB₁ ed AFB₂ mostra attività citotossica/antiproliferativa in cellule J774A.1 praticamente sovrapponibile a quella esercitata dalla singola AFB₁, lasciandoci concludere che, anche in questo caso come già precedentemente dimostrato per NIV e DON nello stesso modello sperimentale, tra le due micotossine analizzate non si instaurano interazioni; in più, l'associazione di AFB₁ ed AFM₁ riduce l'effetto antiproliferativo osservato in seguito ad incubazione delle cellule J774A.1 con la sola AFB₁.

L'analisi citofluorimetrica sui macrofagi J774A.1 esposti sia ai tricoteceni sia alle aflatossine B₁ e B₂ al fine di verificare se all'azione antiproliferativa/citotossica osservata fosse associata un'attività proapoptotica ha evidenziato che NIV induce un effetto proapoptotico alle concentrazioni di 25 e 50 µM superiore a quello provocato da DON alle stesse concentrazioni (P<0.01, NIV vs DON). Tali risultati sono in accordo con diversi studi che indicano la capacità dei tricoteceni di aumentare l'apoptosi nei macrofagi (Zhou et al., 2005; Yang et al., 2000). In secondo luogo, i nostri risultati non hanno evidenziato alcun significativo effetto proapoptotico nelle cellule trattate con aflatossine B₁ e B₂, singolarmente ed in combinazione, per 24, 48 e 72 ore nonostante l'ampio *range* di concentrazione utilizzato (5-50 µM), facendo ipotizzare un'attività di tipo antiproliferativa piuttosto che citotossica da parte di tali xenobiotici.

L'analisi del ciclo cellulare può contribuire ulteriormente alla comprensione del meccanismo alla base degli effetti tossici di tali micotossine sui macrofagi J774A.1. I dati ottenuti al FACS hanno evidenziato per entrambi i tricoteceni una significativa riduzione della fase S unita all'arresto delle cellule nella fase G₀/G₁ rispetto alle cellule di controllo indicando che tali micotossine sono dotate di attività citostatica. I nostri risultati sono strettamente in accordo con altri studi in cui il blocco del ciclo cellulare nella stessa fase è stato osservato in diverse linee cellulari incubate

in presenza di DON (Tiemann et al., 2003). Al contrario, il trattamento delle cellule con AFB₁ ed AFB₂ (50 µM) per 24 ore, ha evidenziato un'alterazione della distribuzione percentuale delle cellule nelle varie fasi del ciclo cellulare rispetto al controllo; in particolare è stata rilevata una riduzione significativa delle cellule nella fase G₀/G₁ in seguito a trattamento con AFB₁ da sola e associata con AFB₂ mentre la sola AFB₁ ha causato un blocco del ciclo cellulare in fase S, in accordo con i risultati di uno studio condotto in ratti trattati con AFB₁ e poi sacrificati dopo 26 ore in cui veniva osservata un'elevata percentuale di cellule in fase S, verosimilmente, come conseguenza del forte danno genetico indotto dalla micotossina (Raj et al., 1998). Analogamente, Ricordy et al. (2002) hanno dimostrato che l'AFB₁ provoca un blocco del ciclo cellulare in fase S in cellule di neuroblastoma ed epatoma umano verosimilmente mediato dalla proteina p53, espressa in presenza di danno al DNA.

Dal momento che per alcune delle aflatossine studiate nel corso della presente ricerca non è stato evidenziato alcun effetto citotossico, un ulteriore obiettivo della ricerca è stato quello di analizzare l'attivazione dei macrofagi J774A.1 in seguito ad incubazione con AFB₁, AFB₂, AFM₁ ed AFM₂, singolarmente e in combinazione, seguita da stimolazione con LPS attraverso il dosaggio di nitriti. L'ossido nitrico (NO), altamente reattivo e dotato di attività battericida, rappresenta un mediatore di numerosi processi biologici ed è implicato nel mantenimento nell'infiammazione (Moon et al., 2000). Esso è prodotto dall'enzima NO sintetasi (NOS) di cui esistono tre isoforme, due costitutivamente espresse nelle cellule ed una inducibile (iNOS) che viene trascritta in risposta a stimoli specifici. In particolare, la iNOS, originariamente caratterizzata in macrofagi murini, è responsabile della sintesi discontinua di elevate quantità di NO in seguito a stimolazione da parte di citochine (IFN-β, IFN-γ e TNF-α) e/o prodotti microbici quali LPS (Sugiyama et al., 2010; Sakai et al., 2006; Jacobs et al., 2001; Snyder and Bredt, 1992). I risultati hanno dimostrato che l'esposizione dei macrofagi J774A.1 alle aflatossine B₁, B₂, M₁ e M₂ (4-32 µM), singolarmente, comporta una riduzione significativa della produzione dei nitriti soltanto alla più alta concentrazione testata mentre combinando le due aflatossine B₁ e B₂ oppure i loro metaboliti idrossilati è stata riscontrata un'ulteriore e significativa riduzione della produzione di nitriti anche alle concentrazioni più basse (pari a 16 e 4 µM). Tali

risultati concordano con quelli di diversi studi sia *in vivo* che *in vitro* in cui viene riscontrata una significativa inibizione dose-dipendente della produzione di NO in macrofagi murini peritoneali stimolati con LPS ed esposti a AFB₁ verosimilmente dovuta ad un'inibita espressione della iNOS (Moon et al., 2000; 1999; 1998).

Le proteine chinasi attivate da mitogeno (MAPK) modulano diversi processi fisiologici tra cui la crescita, la differenziazione e l'apoptosi delle cellule (Cobb, 1999). Diversi autori hanno dimostrato che i tricoteceni attivano rapidamente le MAPK che giocano un ruolo fondamentale nei *pathways* che portano all'induzione dell'apoptosi cellulare (Pestka et al., 2004; Shifrin and Anderson, 1999). È stato dimostrato, ad esempio, che DON induce apoptosi in cellule linfoblastoidi umane attraverso un incremento dell'attività di p38 (Baltriukiene et al., 2007). Zhou e colleghi (2005) hanno dimostrato che l'apoptosi indotta da DON in macrofagi murini RAW 264.7 è mediata dall'attivazione di diverse MAPK. Un ulteriore studio ha concluso che l'apoptosi indotta da diversi tricoteceni (tra cui DON) risulta verosimilmente mediata dall'attivazione di diverse proteine e MAPK tra cui p38, p53 e caspasi (Pestka et al., 2004).

Le *extracellular signal-regulated kinase* (ERK1/2) rivestono un ruolo importante nel controllo e nella progressione del ciclo cellulare, nel differenziamento e nella proliferazione cellulare (Yao and Seger, 2009). Tuttavia, in alcuni modelli cellulari (ad esempio i neuroni) e a seconda dello stimolo, tali MAPK sembrano essere coinvolte in *pathways* proapoptotici (Cagnol and Chambard, 2010). Uno studio effettuato in macrofagi RAW 246.7 esposti a DON ha evidenziato una precoce attivazione di ERK 1/2, tuttavia in presenza di un inibitore specifico è stato rilevato un incremento dell'apoptosi (Pestka et al., 2004). Nel nostro sistema sperimentale abbiamo rilevato un incremento dell'attivazione di ERK1/2 che contrasta con gli effetti proapoptotici attribuiti a NIV e DON, dimostrati dal presente studio e da altri lavori presenti in letteratura. Una possibile spiegazione potrebbe essere che l'attivazione di ERK 1/2, simultaneamente ad altre proteine proapoptotiche come p38, favorirebbe l'espressione di particolari geni, ad esempio quelli delle citochine.

L'apoptosi è innescata da due distinti *pathways* di trasduzione del segnale: la via intrinseca e quella estrinseca. La via intrinseca coinvolge la traslocazione della proteina Bax alla membrana mitocondriale con conseguente formazione di un complesso proapoptotico. La via estrinseca prevede l'interazione di un ligando ad un recettore presente nella membrana plasmatica che porta all'attivazione della caspasi-8 (Schultz and Harrington, 2003). I nostri risultati hanno dimostrato che l'espressione di Bax risulta aumentata nei macrofagi trattati con NIV e DON rispetto al controllo; inoltre, l'espressione di Bax risulta maggiore dopo 8 ore di incubazione delle cellule con le micotossine rispetto al trattamento per 24 ore confermando il ruolo di tale proteina nella fase iniziale del processo apoptotico. Il complesso proapoptotico che coinvolge Bax induce pori nella membrana mitocondriale che causano il rilascio di citocromo C che si lega al fattore Apaf1 innescando quindi la cascata delle caspasi con l'attivazione della caspasi-9 che attiva, a sua volta, la caspasi-3. Quest'ultima rappresenta una caspasi effettrice che degrada una varietà di componenti cellulari culminando nel fenomeno apoptotico. Numerosi risultano in letteratura i lavori relativi al coinvolgimento delle caspasi nell'apoptosi indotta dai tricoteceni (Bensassi et al., 2009; Zhou et al., 2005; Holme et al., 2003; Nagase et al., 2001). Nel corso della ricerca corrente, l'analisi dell'espressione della caspasi-3 ha evidenziato un'attivazione di tale proteina nei macrofagi esposti a NIV e DON già dopo 8 ore di incubazione.

Allo scopo di confermare il coinvolgimento della caspasi-3 nell'apoptosi indotta da NIV e DON, abbiamo valutato i livelli di espressione dell'enzima poli ADP-ribosio polimerasi 1 (PARP-1). PARP-1 rappresenta il principale componente di una famiglia di 18 enzimi presenti prevalentemente nel nucleo degli eucarioti che catalizzano modificazioni post-traduzionali che consistono nella ribosilazione di proteine nucleari (tra cui la stessa PARP) coinvolte nell'organizzazione della cromatina, nella riparazione e nel metabolismo del DNA (Amè et al., 2004). Tale enzima risulta attivato da interruzioni nella molecola di DNA (Dantzer et al., 2006); esso è responsabile di una risposta cellulare precoce al danno al DNA causato da agenti genotossici endogeni ed ambientali; tuttavia, in caso di notevole danno al DNA, PARP-1 promuove l'apoptosi favorendo la traslocazione nel nucleo di AIF

(*apoptosis inducing factor*), flavoproteina normalmente presente all'interno dello spazio tra la membrana mitocondriale esterna e quella interna (Yu et al., 2002; Oliver et al., 1998). Durante le fasi conclusive del processo apoptotico, in numerosi modelli cellulari, di norma si verifica il taglio proteolitico di PARP-1 ad opera di caspasi-3 e caspasi-7 che porta alla formazione di due frammenti con conseguente separazione dell'estremità N-terminale contenente il dominio che lega il DNA dall'estremità catalitica C-terminale (Yu et al., 2001; Boulares et al., 1999). Diversi tricoteceni sono in grado di indurre il clivaggio di PARP-1 ad opera delle caspasi. Jun et al. (2007) hanno evidenziato che il diacetossiscirpenolo (DAS) induce il clivaggio di PARP-1 in cellule Jurkat in accordo con i risultati di Lee et al (2006) nello stesso modello cellulare in seguito ad esposizione a diversi tricoteceni. Analogamente, è stato riscontrato un aumento dei livelli di frammenti di PARP-1 in promielociti umani HL-60 già dopo 3 ore di incubazione in presenza di micotossine T-2 ed HT-2 (Holme et al., 2003). Nel corso dello studio da noi intrapreso, è stato riscontrato un notevole incremento dei livelli dei frammenti di PARP-1 nei macrofagi esposti a NIV e DON.

6. CONCLUSIONI

L'attenzione che le discipline tossicologiche veterinarie ripongono verso le micotossine riconosce una duplice motivazione; da una parte la *Tossicologia veterinaria* studia gli effetti esercitati dalle micotossine sulla salute degli animali a partire dagli aspetti tossicocinetici e tossicodinamici fino a quelli preventivi, dall'altra la *Tossicologia dei residui*, disciplina coinvolta a pieno titolo nella valutazione della sicurezza alimentare per quanto attiene al rischio chimico, è impegnata nella tutela della salute dell'uomo che, come accennato, può essere esposto a tali contaminanti oltre che attraverso alimenti di origine vegetale anche, seppur in misura minore, attraverso alimenti di origine animale.

Si consideri, inoltre, che la presenza di micotossine negli alimenti zootecnici, anche al di sotto delle concentrazioni necessarie per provocare i sintomi clinici di micotossicosi, può compromettere il benessere animale con prevedibili ricadute negative tanto sulle *performances* produttive quanto sulla qualità dei prodotti di origine animale. Pertanto, al fine di garantire la qualità e la sicurezza degli alimenti, sono state introdotte una serie di norme comunitarie che fissano, per alcune micotossine, livelli massimi tollerabili in diverse tipologie di alimento. La normativa comunitaria sulle micotossine (Regolamento CE n. 1881/2006 e successive modifiche), emanata dalla Commissione Europea sulla scorta delle valutazioni del rischio espresse dall' *European Food Safety Authority* (EFSA) e di quelle tossicologiche espresse dal *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), è materia in continua evoluzione sia per le nuove conoscenze scientifiche acquisite attraverso la letteratura internazionale sia per le ripercussioni che le misure adottate determinano negli scambi commerciali, anche con i Paesi terzi che spesso rappresentano importanti produttori di materie prime.

In tale contesto si colloca la corrente ricerca che ha voluto fornire un contributo alla comprensione dei meccanismi alla base dell'immunotossicità di alcune micotossine, in quanto le conoscenze attualmente disponibili sono ancora alquanto limitate rispetto al forte impatto che tali contaminanti hanno sulla salute umana ed animale. In particolare, risulta necessario approfondire i potenziali rischi derivanti

dalle co-contaminazioni di più micotossine, in considerazione del fatto che tale evenienza risulta molto frequente in condizioni naturali e che, a tutt'oggi però, non è tenuta nella giusta considerazione.

In conclusione, nel corso del presente studio abbiamo dimostrato l'effetto citotossico esercitato da differenti micotossine (α -ZEA, DON, NIV, AFB₁), singolarmente e diversamente combinate tra loro (rapporto 1:1) in macrofagi J774A.1 ed in linfociti di suino in coltura primaria, sottolineando al contempo, la validità di tale modello sperimentale per valutazioni immunotossicologiche *in vitro*. Abbiamo, inoltre, dimostrato che, in entrambi i modelli utilizzati, NIV mostra un maggiore effetto citotossico rispetto a DON e che AFB₁ esercita, sui macrofagi, un'azione antiproliferativa non mostrata né dal suo metabolita idrossilato, AFM₁, né da AFB₂ ed AFM₂. Gli effetti immunotossici delle aflatossine studiate possono essere riconducibili ad un'inibizione della produzione di metaboliti attivi dell'ossigeno, come NO. Lo studio dei meccanismi alla base della tossicità di NIV e DON lascia ipotizzare che l'attività antiproliferativa manifestata da entrambi i tricoteceni nei macrofagi murini potrebbe essere attribuita ad un'accelerazione del *pathway* apoptotico che coinvolge una maggiore attivazione della proteina ERK, l'induzione della proteina proapoptotica Bax, l'attivazione della caspasi-3 effettrice e il conseguente taglio proteolitico dell'enzima di riparazione del DNA, PARP-1. Inoltre, è stato riscontrato un arresto del ciclo cellulare nella fase G₀/G₁ in seguito ad incubazione delle cellule in presenza di NIV e DON mentre AFB₁ è responsabile di un incremento delle cellule in fase S.

BIBLIOGRAFIA

- Amè JC, Spenlehauer C, de Murcia G, The PARP superfamily, *Bioessays*, 2004, 26(8):882-893.
- Aycicek H, Yarsan E, Sarimehmetoglu B, Cakmak O, Aflatoxin M1 in white cheese and butter consumed in Istanbul, Turkey, *Vet. Hum. Toxicol.*, 2002, 44(5):295-296.
- Baltriukiene D, Kalvelyte A, Bukelskiene V, Induction of apoptosis and activation of JNK and p38 MAPK pathways in deoxynivalenol-treated cell lines, *Altern. Lab. Anim.*, 2007, 35(1):53-59.
- Barrier-Guillot B, Fusarium toxins in maize, IV International Fusarium-toxin Forum, Brussels, 15-16 January 2007.
- Battacone G, Nudda A, Palomba M, Pascale M, Nicolussi P, Pulina G, Transfer of aflatoxin B1 from feed to milk and from milk to curd and whey in dairy sheep fed artificially contaminated concentrates, *J. Dairy Sci.*, 2005, 88(9):3063-3069.
- Bennett JW, Klich M, Mycotoxins, *Clinic. Microb. Reviews*, 2003, 16:497-516.
- Bensassi F, El Golli-Bennour E, Abid-Essefi S, Bouaziz C, Hajlaoui MR, Bacha H, Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells, *Toxicology*, 2009, 264(1-2):104-109.
- Bernhoft A, Trichothecenes in oats – temporal trends and factors influencing their occurrence, 7th International Fusarium-toxins Forum, Brussels, 1-2 February, 2010.
- Bircan C, Incidence of ochratoxin A in dried fruits and co-occurrence with aflatoxins in dried figs, *Food Chem. Toxicol.*, 2009, 47(8):1996-2001.
- Bognanno M, La Fauci L, Ritieni A, Tafuri A, De Lorenzo A, Micari P, Di Renzo L, Ciappellano S, Sarullo V, Galvano F, Survey of the occurrence of Aflatoxin M1 in ovine milk by HPLC and its confirmation by MS, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50(3):300-305.
- Bondy GS, Pestka JJ, Immunomodulation by fungal toxins, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 2000, 3(2):109-143.

- Brera C, Iafrate E, De Santis B, Debegnach F, Miraglia M, Valutazione dell'esposizione della popolazione italiana alla ocratossina A nel cacao e nel cioccolato, Rapporti ISTISAN 09/C6 "Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica" ISS, Roma, 2009, pp. 5.
- Bretz M, Beyer M, Cramer B, Knecht A, Humpf HU, Thermal degradation of the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54(17):6445-6451.
- Cagnol S, Chambard JC, ERK and cell death: mechanisms of ERK induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence, *FEBS J.* 2010, 277(1):2-21.
- Caloni F, Cortinovis C, Toxicological effects of aflatoxins in horses, *The Veterinary Journal*, 2010, doi: 10.1016/j.tvjl.2010.06.002.
- Caloni F, Nebbia C, Micotossine IN: Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali, a cura di Nebbia C., EdiSES editore, Napoli, Italia, 2009, pp. 453-464.
- Caloni F, Stammati A, Friggè G, De Angelis, I, Aflatoxin M1 absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model, *Toxicon*, 2006, 47:409-415.
- Campbell AW, Thrasher JD, Gray MR, Vojdani A. Mold and mycotoxins: effects on the neurological and immune systems in humans, *Adv. Appl. Microbiol.*, 2004, 55:375-406.
- Caruso M, Mariotti A, Zizzadoro C, Zaghini A, Ormas P, Altafini A, Belloli C, A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B1, *Toxicon*, 2009, 53:400-408.
- Castegnaro M, Canadas D, Vrabcheva T, Petkova-Bocharova T, Chernozemsky IN, Pfohl-Leszkowicz A, Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxin A through biomarkers, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006, 50: 519-529.
- Cavret S, Lecoœur S, Fusariotoxin transfer in animal, *Food Chem. Toxicol.*, 2006, 44: 444-453.
- Charoenpornsook K, Fitzpatrick JL, Smith JE, The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro, *Mycopathologia*, 1998, 143:105-111.

- Cheng YH, Ding ST, Chang MH, Effect of fumonisins on macrophage immune functions and gene expression of cytokines in broilers, *Arch. Anim. Nutr.*, 2006, 60(4):267-276.
- Chiavaro E, Lepiani A, Colla F, Bettoni P, Pari E, Spotti E, Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and a quick fluorometric method, *Food Addit. Contam.*, 2002, 19(6):575-581.
- Cobb MH, MAP kinase pathway. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1999, 71(3-4):479-500.
- Creppy EE, Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe, *Toxicol. Letters*, 2002, 127:19-28.
- Curtui VG, Gareis M, Usleber E, Märtlbauer E, Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone, *Food Addit. Contam.*, 2001, 18(8):730-738.
- Cusumano V, Costa GB, Trifiletti R, Merendino RA, Mancuso G, Functional impairment of rat Kupffer cells induced by aflatoxin B1 and its metabolites, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1995, 10(2):151-155.
- Damsgaard CT, Lauritzen L, Calder PC, Kjaer TM, Frokiaer H, Whole-blood culture is a valid low-cost method to measure monocytic cytokines - a comparison of cytokine production in cultures of human whole-blood, mononuclear cells and monocytes, *J. Immunol. Methods*, 2009, 340(2):95-101.
- Dantzer Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair, *Methods Enzymol.*, 2006, 409:493-510.
- Danicke S, Goyarts T, Doll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G, Effects of Fusarium toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs, *Toxicol. Lett.*, 2006, 165:297-311.
- Diaz GJ, Espitia E, Occurrence of aflatoxin M1 in retail milk samples from Bogotá, Colombia, *Food Addit. Contam.*, 2006, 23(8):811-815.
- Diekman MA, Green ML, Mycotoxins and reproduction in domestic livestock, *J. Anim. Sci.*, 1992, 70:1615-1627.
- Diesing AK, Nossol C, Panther P, Walk N, Post A, Kluess J, Kreutzmann P, Danicke S, Rothkötter HJ, Kahlert S, Mycotoxin deoxynivalenol (DON) mediates

- biphasic cellular response in intestinal porcine epithelial cell lines IPEC-1 and IPEC-J2, *Toxicol. Lett.*, 2010, doi:10.1016/j.toxlet.2010.10.006
- D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC, Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1999, 80:183-205.
- Dombrink-Kurtzman MA, Gomez-Flores R, Weber RJ, Activation of rat splenic macrophage and lymphocytes functions by fumonisin B₁, *Immunopharmacol.*, 2000, 49:401-409.
- Domijan AM, Peraica M, Cvjetković B, Turcin S, Jurjević Z, Ivić D., Mould contamination and co-occurrence of mycotoxins in maize grain in Croatia, *Acta Pharmacol.*, 2005, 55(4):349-356.
- Dragacci S, Grosso F, Bire R, Fremy JM, Coulon S, A French monitoring programme for determining ochratoxin A occurrence in pig kidneys, *Nat. Toxins*, 1999, 7:167-173.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to fumonisins as undesirable substance in animal feed, *The EFSA Journal*, 2005, 235:1-32.
- EFSA, Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Aflatoxin B₁ as undesirable substance in animal feed, *The EFSA Journal*, 2004, 39:1-27.
- Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AA, Tester RF, Occurrence of aflatoxin M₁ in randomly selected North African milk and cheese samples, *Food Addit. Contam.*, 2004, 21(6):592-597.
- Eriksen GS, Petterson H, Lundh T, Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and de-epoxy metabolites, *Food Chem. Toxicol.*, 2004, 42:619-624.
- Eriksen GS, Pettersson H, Lindberg JE, Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs, *Arch Tierernahr*, 2003, 57(5):335-345.
- European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 1: Deoxynivalenol (DON), 2 December 1999.

- European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 2: Zearalenone (ZEA), 22 June 2000.
- European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 3: Fumonisin B₁ (FB₁), 17 October 2000.
- European Commission, Opinion of the Scientific Committee on Food, Fusarium Toxins, part 4: Nivalenol (NIV), 19 October 2000.
- European Mycotoxin Awareness Network (EMAN), Basic fact sheet 8, Trichothecenes, 2006.
- Ferrari L, Cantoni AM, Borghetti P, De Angelis E, Corradi A., Cellular immune response and immunotoxicity induced by DON (deoxynivalenol) in piglets, *Vet Res Commun.*, 2009, Suppl 1:133-135.
- Fink-Gremmels J, Mycotoxins: their implications for human and animal health. *The Veterinary Quarterly*, 1999,21:115-120.
- Fuchs R, Peraica M, Ochratoxin A in human kidney diseases, *Food Addit. Contam.*, 2005, 22(1):53-57.
- Galvano F, Galofaro V, Ritieni A, Bognanno M, De Angelis A, Galvano G, Survey of the occurrence of aflatoxin M₁ in dairy products marketed in Italy: second year of observation, *Food Addit. Contam.*, 2001, 18(7):644-646.
- Girish CK, Smith TK, Boermans HJ, Anil Kumar P, Girgis GN, Effects of dietary Fusarium mycotoxins on intestinal lymphocyte subset populations, cell proliferation and histological changes in avian lymphoid organs, *Food Chem. Toxicol.* 2010, 48(10):3000-3007.
- Gouze ME, Laffitte J, Dedieu G, Galinier A, Thouvenot JP, Oswald IP, Galtier P., Individual and combined effects of low oral doses of deoxynivalenol and nivalenol in mice, *Cell. Mol. Biol.*, 2005, 51:809-817.
- Govaris A, Roussi V, Koidis PA, Botsoglou NA, Distribution and stability of aflatoxin M₁ during production and storage of yogurt, *Food Addit. Contam.*, 2002, 19(11):1043-1050.
- Goyarts T, Grove N, Danicke S, Effects of Fusarium toxin deoxynivalenol from naturally contaminated wheat given subchronically or as one single dose on the

- in vivo protein synthesis of peripheral blood lymphocytes and plasma proteins in the pig, *Food Chem. Toxicol.*, 2006, 44(12):1953-1965.
- Goyarts T, Danicke S, Rothkotter HJ, Spilke J, Tiemann U, Schollenberger M, On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively, *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 2005, 52:305-314.
- Groten JP, Tajima O, Feron VJ, Schoen ED., Statistically designed experiments to screen chemical mixtures for possible interactions, *Environ. Health Perspect.*, 1999, 106(6):1361-1365.
- Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ, Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review, *Environ. Toxicol. Pharm.*, 2002, 11:309-320.
- Gutmann L, Chou SM, Pore RS, Fusariosis, myasthenic syndrome, and aplastic anemia, *Neurology*, 25(10):922-926.
- Hazel CM, Patel S, Influence of processing on trichothecene levels, *Toxicol. Letters*, 2004, 153:51-59.
- Hinton DM, Myers MJ, Raybourne RA, Francke-Carroll S, Sotomayor RE, Shaddock J, Warbritton A, Chou MW. Immunotoxicity of aflatoxin B1 in rats: effects on lymphocytes and the inflammatory response in a chronic intermittent dosing study, *Toxicol. Sci.*, 2003, 73(2):362-377.
- Holme JA, Morrison E, Samuelsen JT, Wiger R, Lag M, Schwarze PE, Bernhoft A, Refsnes M, Mechanisms involved in the induction of apoptosis by T.2 and HT-2 toxins in HL-60 human promyelocytic leukemia cells, *Cell. Biol. Toxicol.*, 2003, 19(1):53-68.
- Hussein HS, Brasel JM, Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals, *Toxicology*, 2001, 167:101-134.
- Hymery N, Sibiril Y, Parent-Massin D, In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells, *Toxicol. In Vitro*, 2006, 20:899-909.
- Igarashi H, Kouro T, Yokota T, Comp PC, Kincade PW, Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98(26):15131-15136.

- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), Centro Emiliano Romagnolo di Epidemiologia Veterinaria, Lettera di informazione n. 51 – novembre 2003.
- Jakab GJ, Hmieleski RR, Zarba A, Hemenway DR, Groopman JD, Respiratory aflatoxicosis: suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1994, 125(2):198-205.
- Janeway CA, Travers P, *Immunobiologia*, ed. Piccin, 1996, Padova (Italy).
- Johnson VJ, Sharma RP, Gender-dependent immunosuppression following subacute exposure to fumonisin B1, *Intern. Immunopharm.*, 2001, 1:2023-2034.
- Jørgensen K, Petersen A, Content of ochratoxin A in paired kidney and meat samples from healthy Danish slaughter pigs, *Food Addit. Contam.*, 2002, 19(6):562-567.
- Kolf-Clauw M, Castellote J, Joly B, Bourges-Abella N, Raymond-Letron I, Pinton P, Oswald IP, Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: histopathological analysis, *Toxicol. In Vitro*, 2009, 23(8):1580-1584.
- Kebly M, Bernhoft A, Hofer CC, Morrison E, Larsen HJ, Flaoyen A, The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on in vitro proliferation of porcine lymphocytes, *Mycopathologia*, 2004, 158:317-324.
- Keck BB, Bodine AB, The effects of fumonisin B1 on viability and mitogenic response of avian immune cell, *Poult Sci.*, 2006, 85(6):1020-1024.
- Kelman BJ, Robbins CA, Swenson LJ, Hardin BD., Risk from inhaled mycotoxins in indoor office and residential environments, *International Journal of Toxicology*, 2004, 23(1):3-10.
- Khera KS, Whalen C, Angers G, Vesonder RF, Kuiper-Goodman T, Embryotoxicity of 4-deoxynivalenol (vomitoxin) in mice, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1982, 29(4):487-491.
- Kimanya ME, De Meulenaer B, Tiisekwa B, Ndomondo-Sigonda M, Devlieghere F, Van Camp J, Kolsteren P., Co-occurrence of fumonisins with aflatoxins in home-stored maize for human consumption in rural villages of Tanzania, *Food Addit. Contam. Part A.*, 2008, 25(11):1353-1364.

- Kubosaki A, Aihara M, Park BJ, Sugiura Y, Shibutani M, Hirose M, Suzuki Y, Takatori K, Sugita-Konishi Y., Immunotoxicity of nivalenol after subchronic dietary exposure to rats, *Food Chem. Toxicol.*, 2008, 46(1):253-258.
- Langezaal I, Coecke S, Hartung T., Whole blood cytokine response as a measure of immunotoxicity, *Toxicol. In Vitro*, 2001, 15:313-318.
- Lankveld DPK, Van Loveren H, Baken KA, Vandebriel RJ, In vitro testing for direct immunotoxicity: state of the art, *Methods Mol. Biol.*, 2010, 598:401-423.
- Lee DH, Park T, Kim HW, Induction of apoptosis by disturbing mitochondrial-membrane potential and cleaving PARP in Jurkat T cells through treatment with acetoxyscirpenol mycotoxins, *Biol. Pharm. Bull.*, 2006, 29(4):648-654.
- Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, Salzano S, Ursini MV, Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes, *Mutat. Res.*, 2004, 557(1):19-27.
- Liu BH, Yu FY, Chan MH, Yang YL, The Effects of mycotoxins, fumonisin B1 and aflatoxin B1, on primary swine alveolar macrophages, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2002, 180:197-204.
- Luongo D, Severino L, Bergamo P, D'Arienzo R, Rossi M, Trichothecenes NIV and DON modulate the maturation of murine dendritic cells, *Toxicon*, 2010, 55(1):73-80.
- Luongo D, De Luna R, Russo R, Severino L., Effects of four Fusarium toxins (fumonisin B(1), alpha-zearalenol, nivalenol and deoxynivalenol) on porcine whole-blood cellular proliferation. *Toxicon*, 2008, 52(1):156-62.
- Luongo D, Severino L, Bergamo P, De Luna R, Lucisano A, Rossi M, Interactive effects of fumonisin B1 and alpha-zearalenol on proliferation and cytokine expression in Jurkat T cells, *Toxicol. In Vitro*, 2006, 20(8):1403-1410.
- Mantovani A, Frazzoli C, La Rocca C. Risk assessment of endocrine-active compounds in feeds, *Veterinary Journal*, 2009, 182(3): 392-401.
- Marasas WF, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WC, Allegood J, Martínez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill AH Jr., Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport,

- and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize, *J. Nutr.*, 2004, 134(4):711-716.
- Marasas WF, Kellerman TS, Gelderblom WC, Coetzer JA, Thiel PG, van der Lugt JJ, Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *Fusarium moniliforme*, *J. Vet. Res.*, 1988, 55(4):197-203.
- Marin DE, Gouze ME, Taranu I, Oswald IP., Fumonisin B1 alters cell cycle progression and interleukin-2 synthesis in swine peripheral blood mononuclear cells, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, 51(11):1406-1412.
- Martins ML, Martins HL, Aflatoxin M1 in yoghurts in Portugal, *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 91(3):315-317.
- Martins ML, Martins HM, Bernardo F, Aflatoxins in spices marketed in Portugal, *Food Addit. Contam.*, 2001, 18(4):315-319.
- Marzocco S, Piccinelli AL, Rastrelli L, Mazzon E, Cuzzocrea S, Autore G, Inhibition of inducible nitric oxide synthase in vitro and in vivo by a water-soluble extract of *Wendita calysina* leaves, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 2007, 375(6):349-58.
- Mayer CF, Endemic panmyelotoxicosis in the Russian grain belt. I. The clinical aspects of alimentary toxic aleukia (ATA); a comprehensive review, *Mil. Surg.*, 1953, 113(3):173-189.
- Meissonier M, Pinton P, Laffitte J, Cossalter AM, Gong YY, Wild CP, Bertin G, Galtier P, Oswald IP, Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 231:142-149.
- Methenitou G, Maravelias C, Athanaselis S, Dona A, Koutselinis A., Immunomodulative effects of aflatoxins and selenium on human natural killer cells, *Vet. Hum. Toxicol.*, 2001, 43(4):232-234.
- Meucci V, Micotossine, IN: *Tossicologia Veterinaria*, a cura di Mengozzi G., Soldani G. Idelson-Gnocchi editore, Napoli, Italia, 2010, pp. 173-186.
- Mikami O, Yamaguchi H, Murata H, Nakajima Y, Miyazaki S., Induction of apoptotic lesions in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine

- mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets, *J. Vet. Sci.*, 2010, 11(2):107-113.
- Moon EY, Pyo S, Aflatoxin B1 inhibits CD14-mediated nitric oxide production in murine peritoneal macrophages, *International Journal of Immunopharmacology*, 2000, 22:237-246.
- Moon EY, Rhee DK, Pyo S, Involvement of NO, H₂O₂ and TNF- α in the reduced antitumor activity of murine peritoneal macrophages by aflatoxin B1, *Cancer Lett.*, 1999, 136:167-176.
- Moon EY, Han JJ, Rhee DK, Pyo S, Aflatoxin B1 induced suppression of nitric oxide production in murine peritoneal macrophages, *J. Toxicol. Environ. Health A*, 1998, 55(7):517-530.
- Moss MO, Thrane U, Fusarium taxonomy with relation to trichothecene formation, *Toxicol. Letters*, 2004, 153:23-28.
- Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Methods*, 65:55-36.
- Motawee MM, McMahon DJ. Fate of aflatoxin M(1) during manufacture and storage of feta cheese, *Journal of Food Science*, 2009, 74(5):T42-5.
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS, Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ER α) and ER β in human cells, *Toxicology Sciences*, 2004, 80(1):14-25.
- Nagase M, Alam MM, Tsushima A, Yoshizawa T, Sakato N, Apoptosis induction by T-2 toxin: activation of caspase-9, caspase-3, and DFF-40/CAD through cytosolic release of cytochrome c in HL-60 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, 65(8):1741-1747.
- Nasri T, Bosch RR, Voorde S, Fink-Gremmels J., Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes, *Toxicol. In Vitro*, 2006, 20(6):832-840.
- Neal GE, Eaton, DL, Judah DJ, Verma A, Metabolism and toxicity of aflatoxin M1 and B1 in human derived in vitro system, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1998, 151:152-158.

- Oliver FJ, de la Rubia G, Rolli V, Ruiz-Ruiz MC, de Murcia G, Murcia JM, Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant, *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(50):33533-33539.
- Oswald IP, Marin DE, Bouhet S, Pinton P, Taranu I, Accensi F., Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals, *Food Addit. Contam.*, 2005, 22(4): 354-360.
- Parent-Massin D, Haematotoxicity of trichothecenes, *Toxicol. Lett.*, 2004, 153:75-81.
- Pestka JJ, Smolinski AT, Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans, *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.*, 2005, 8: 39-69.
- Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ, Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox, *Toxicol. Lett.*, 2004, 153:61-73.
- Pinton P, Braicu C, Nougayrede JP, Laffitte J, Taranu I, Oswald IP, Deoxynivalenol impairs porcine intestinal barrier function and decreases the protein expression of claudin-4 through a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism, *J. Nutr.*, 2010, 140(11):1956-1962.
- Pinton P, Accensi F, Beauchamp E, Cossalter AM, Callu P, Grosjean F, Oswald IP., Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses, *Toxicol. Lett.*, 2008, 177(3):215-222.
- Placinta CM, D'Mello JPF, Macdonald AMC, A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, *Anim. Feed Sci. Technol.*, 1999, 78:21-37.
- Plizzari L, Scudellari D, Cattaneo M, Corbellini M, Brandolini A, Pascale M, Desiderio E, Monitoraggio della presenza di deossinivalenolo (DON) nella granella di frumento tenero, Rapporti ISTISAN 09/C6 "Le micotossine nella filiera agro-alimentare e zootecnica" ISS, Roma, 2009, pp. 68.
- Prandini A, Tansini G, Sigolo S, Filippi L, Laporta M, Piva G, On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products, *Food. Chem. Toxicol.*, 2009, 47(5):984-991.

- Ramakrishna Y, Bhat RV, Ravindranath V, Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicosis outbreak and from sorghum cultivars, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55(10):2619-2620.
- Raj HG, Gupta K, Rohil V, Bose M, Biswas G, Singh SK, Jain SC, Parmar VS, Olsen CE, Wengel J, Aflatoxin B1-induced micronuclei and cell cycle alterations in lung and bone marrow cells and their modulation by *Piper argyrophyllum* extract, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 1998, 18(5):249-261.
- Richetti A, Cavallaro A, Ainis T, Fimiani V, Effect of some mycotoxins on superoxide anion production of isolated human neutrophils and in whole blood, *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 2003, 25(3):441-449.
- Ricordy Impairment of cell cycle progression by aflatoxin B1 in human cell lines, *Mutagenesis*, 2002, 17(3):241-249.
- Rocha LO, Nakai VK, Braghini R, Reis TA, Kobashigawa E, Corrêa B., Mycoflora and co-occurrence of fumonisins and aflatoxins in freshly harvested corn in different regions of Brazil, *Int. J. Mol. Sci.*, 2009, 10(11):5090-5103.
- Rocha O, Ansari K, Doohan FM, Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review, *Food Addit. Contam.*, 2005, 22: 369-378.
- Roda E, Coccini T, Acerbi D, Castoldi AF, Manzo L, Comparative in vitro and in vivo myelotoxicity of aflatoxins B1 and M1 on haemopoietic progenitors (BFU-E, CFU-E and CFU-GM): species-related susceptibility, *Toxicol. In vitro*, 2010, 24:217-223.
- Rosiles MR, Bautista J, Fuentes VO, Ross F, An outbreak of equine leukoencephalomalacia at Oaxaca, Mexico, associated with fumonisin B1, *Zentr. Veterin. A.*, 1998, 45(5):299-302.
- Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Wilson TM, Production of Fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, 56(10):3225-3226.
- Sangare-Tigori B, Moukha S, Kouadio HJ, Betbeder AM, Dano DS, Creppy EE., Co-occurrence of aflatoxin B1, fumonisin B1, ochratoxin A and zearalenone in

- cereals and peanuts from Côte d'Ivoire, *Food Addit. Contam.*, 2006, 23(10):1000-1007.
- Schlatter J, Toxicity data relevant for hazard characterization, *Toxicol. Lett.*, 2004, 153:83-89.
- Schollenberger M, Muller HM, Ruffle M, Suchy S, Plank S, Drochner W, Natural occurrence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany, *Mycopathologia*, 2006, 161:43-52.
- Schultz DR, Harrington WJ, Apoptosis: Programmed Cell Death at a Molecular Level, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2003, 32(6):345-369.
- Seeling K, Danicke S, Valenta H, Van Egmond HP, Schothorst RC, Jekel AA, Lebzien P, Schollenberger M, Razzazi-Fazeli E, Flachowsky G, Effects of Fusarium toxin-contaminated wheat and feed intake level on the biotransformation and carry-over of deoxynivalenol in dairy cows, *Food Addit. Contam.*, 2006, 23:1008-1020.
- Segvic Klaric M, Cvetnic Z, Pepeljnjak S, Kosalec I., Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, fumonisins and zearalenone in cereals and feed, determined by competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay and thin-layer chromatography, *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2009, 60:427-434.
- Sergent T, Parys M, Garsou S, Pussemier L, Schneider YJ, Larondelle Y, Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations, *Toxicol. Lett.*, 2006, 164(2):167-176.
- Severino L, Luongo D, Bergamo P, Lucisano A, Rossi M, Mycotoxins nivalenol and deoxinivalenol differentially modulate cytokine mRNA expression in Jurkat T cells, *Cytokine*, 2006, 36:75-82.
- Sharma RP., Immunotoxicity of mycotoxins, *J. Dairy Sci.*, 1993, 76(3):892-897.
- Shifrin VI, Anderson P, trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p-38 mitogen activated protein kinase and induces apoptosis, *J. Biol. Chem.*, 1999, 274:13985-13992.
- Silvotti L, Patterino C, Bonomi A, Cabassi E, Immunotoxicological effects on piglets of feeding sows diets containing aflatoxins, *Vet. Rec.*, 1997, 141(18):469-472.

- Sokolovic M, Garaj-Vrhovac V, Ramic S, Simpraga B., Chicken nucleated blood cells as a cellular model for genotoxicity testing using the comet assay, *Food Chem. Toxicol.*, 2007, 45(11):2165-2170.
- Speijers GJA., Speijers MHM, Combined effect of mycotoxins, *Toxicol. Letters*, 2004, 153:91-98.
- Steinman RM, The dendritic cell system and its role in immunogenicity, *Annual Review of Immunology*, 1991, 9:271-296.
- Stoddard MB, Pinto V, Kaiser PB, Zollinger W, Evaluation of a whole-blood cytokine release assay for use in measuring endotoxin activity of group B *Neisseria meningitidis* vaccines made from lipid A acylation mutants, *Clinic. Vacc. Immunol.*, 2010, 17(1):98-107.
- Sugita-Konishi Y, Nakajima M, Tabata S, Ishikuro E, Tanaka T, Norizuki H, Itoh Y, Aoyama K, Fujita K, Kai S, Kumagai S, Occurrence of aflatoxins, ochratoxin A, and fumonisins in retail foods in Japan, *J. Food Prot.*, 2006, 69:1365-1370.
- Sugita-Konishi Y, Pestka JJ, Differential upregulation of TNF-alpha, IL-6, and IL-8 production by deoxynivalenol (vomitoxin) and other 8-ketotrichothecenes in a human macrophage model, *J. Toxicol. Environ. Health*, 2001, 64(8):619-636.
- Sun G, Wang S, Hu X, Su J, Huang T, Yu J, Tang L, Gao W, Wang JS, Fumonisin B1 contamination of home-grown corn in high-risk areas for esophageal and liver cancer in China *Food Addit. Contam.*, 2007, 24(2):181-185.
- Tanchev Y, Dorossiev D, The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later, *IARC Sci. Publ.*, 1991, 115:21-28.
- Tajima O, Schoen ED, Feron VJ, Groten JP, Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interaction, *Food Chem. Toxicol.*, 2002, 40:658-695.
- Theumer MG, Lopez AG, Masih DT, ChulzeSN, Rubinstein HR, Immunobiological effects of fumonisin B1 in experimental subchronic mycotoxicoses in rats, *Clinic. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002, 9(1):149-155.

- Theumer MG, Lopez AG., Masih DT, Chulze SN, Rubistein HR., Immunobiological effects of AFB1 and AFB1-FB1 mixture in experimental subchronic mycotoxicosis in rats. *Toxicology*, 2003, 186(1-2): 159-170.
- Thrum CW, Halsey JF, Measurement of cytokine production using whole blood, *Current Protoc. Immunol.*, 2005, capt. 7, pp. 7.18.
- Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, Trygg K, Lund-Larsen K, Jahrl S, Widenfalk A, Bosnes V, Alexander J, Hult K, Olsen M, Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption, *Food Chem. Toxicol.*, 2001, 39:1145-1151.
- Tutelyan VA, Deoxynivalenol in cereals in Russia, *Tox. Letters*, 2004, 153:173-179.
- Visconti A, Boenke A, Doko MB, Solfrizzo M, Pascale M, Occurrence of fumonisin in Europe and the BCR – measurements and testing projects, *Nat. Toxins*, 1995, 3(4):269-274.
- Voss KA, Platt RN, Riley RT, Meredith WP, Norred WP, Howard PC, Collins TF, Hansen DK, Porter JK, An overview of rodent toxicities: liver and kidney effects of fumonisins and *Fusarium moniliforme*, *Environ. Health Perspect.* 2001, 109(Suppl. 2):259-266.
- Wada K, Hashiba Y, Ohtsuka H, Kohiruimaki M, Masui M, Kawamura S, Endo H, Ogata Y, Effects of mycotoxins on mitogen-stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells, *J. Vet. Med. Sci*, 2008, 70(2):193-196.
- Wang H, Wei H, Ma J, Luo X, The fumonisin B1 content in corn from North China, a high – risk area of esophageal cancer, *J. Environ Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2000, 19(1-2):139-141.
- Yao Z, Seger R, The ERK signaling cascade-views from different subcellular compartments, *Biofactos*, 2009, 35(5):407-416.
- Yoshizawa T, Yamashita A, Luo Y, Fumonisin occurrence in corn from high- and low- risk areas for human esophageal cancer in China, *Appl. Environ. Microb.*, 1994, 1626-1629.

Xue CY, Wang GH, Chen F, Zhang XB, Bi YZ, Cao YC., Immunopathological effects of ochratoxin A and T-2 toxin combination on broilers, *Poultry Sci.*, 2010, 89(6):1162-1166.

Zhou RH, Islam Z, Pestka JJ, Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol, *Tox. Sci.*, 2005, 87(1):113-122.