



Efeitos da aflatoxina B₁ na integridade e morfologia de células intestinais

Effects of aflatoxin B₁ on intestinal cell integrity and morphology

Inês Serrenho^{1,2}, Nádia Vital^{3,5}, Dora Rolo^{3,5}, Joana Pereira^{3,6}, Paulo Matos^{3,6}, Peter Jordan^{3,6}, Paula Alvito^{1,7}

Paula.alvito@insa.min-saude.pt

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

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

(3) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(4) NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(5) Centre for Toxicogenomics and Human Health, NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

(6) BiolSI—Instituto de Biosistemas e Ciências Integrativas, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

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

_Resumo

As micotoxinas são toxinas naturais presentes maioritariamente nos alimentos sendo produzidas por vários géneros de fungos (*Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é um dos carcinógenos mais potentes, conhecido devido à sua elevada hepatotoxicidade em mamíferos, sendo classificada pela Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC) no Grupo 1 (compostos carcinogénicos para humanos). A exposição à AFB₁ ocorre, sobretudo, através da ingestão de alimentos contaminados, existindo um interesse crescente em avaliar os seus efeitos nocivos no trato gastrointestinal (TGI), dado que as células do epitélio intestinal constituem a principal linha de defesa do organismo humano. Existem, no entanto, poucos dados disponíveis sobre o efeito da AFB₁ no intestino na presença de muco, uma importante barreira de proteção intestinal.

O objetivo deste trabalho consistiu na avaliação dos efeitos da exposição de células intestinais à micotoxina AFB₁, nomeadamente, na integridade e morfologia das células intestinais e o papel do muco enquanto barreira protetora, em culturas de células Caco-2 e coculturas de células Caco-2 e HT29-MTX-E12 (produtoras de muco).

Para o desenvolvimento de uma monocamada epitelial e coculturas diferenciadas, foram utilizadas metodologias de cultura de células *in vitro* sendo posteriormente efetuada a monitorização da sua polarização através da determinação da resistência elétrica transepitelial (TEER). Após a exposição das culturas Caco-2, individuais e em cocultura, à AFB₁, durante 24 h, foi avaliada a integridade epitelial e a morfologia das células expostas por microscopia de imunofluorescência confocal.

Os ensaios revelaram que a AFB₁ afetou a integridade epitelial das monocamadas, e causou alterações na morfologia das células Caco-2 expostas, quer em monocultura quer em cocultura com HT29-MTX-E12. É de salientar que no caso das coculturas de células Caco-2/HT29-MTX-E12, o decréscimo na TEER foi menos pronunciado, o que poderá ser atribuído ao papel protetor do muco.

Serão necessários estudos futuros para avaliar o impacto da exposição a AFB₁ e os efeitos protetores do muco no intestino e a sua contribuição para o estado de saúde e doença do indivíduo.

_Abstract

Mycotoxins are natural toxins mostly occurring in food and are produced by several genera of fungi (*Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*). Aflatoxin B₁ (AFB₁) is one of the most potent liver carcinogens and is classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in Group 1 (carcinogenic substances to humans). Exposure to AFB₁ occurs mainly through ingestion of contaminated foodstuffs therefore there is a growing concern related to its effects on the gastrointestinal tract (GIT), given that intestinal epithelial cells constitute the first line of defense of the human organism. There are few data available on the effect of AFB₁ in the presence of mucus, an important intestinal protective barrier. Thus, it is essential to investigate the effects of this mycotoxin on cultures of intestinal mucus-producing cells, which has not been done so far.

This work aimed to assess the epithelial integrity and morphology of individual epithelial Caco-2 cells and its co-culture with HT29-MTX-E12 (mucus producing), after exposure to AFB₁, in order to assess the potential protective role of mucus at the GIT.

In vitro methodologies were used to establish a monolayer of epithelial and differentiate cell cultures and its epithelial barrier integrity was monitored, through the measurement of transepithelial electrical resistance (TEER). After exposure of individual Caco-2 cells and its co-cultures to AFB₁ for 24h, the epithelial integrity was monitored as well as cell morphology by confocal immunofluorescence microscopy.

Results showed that AFB₁ affected the epithelial integrity of polarized Caco-2 monolayers and produced modifications in the morphology of both monocultures and co-cultures of Caco-2 cells exposed to AFB₁. Caco-2/HT29-MTX-E12 co-cultures, however, exhibited a less pronounced decrease in TEER suggesting a protective role from mucus barrier.

Future studies are needed to assess the impact of exposure to AFB₁ and the protective effects of mucus in the intestine and its relevance for health and illness.



_Introdução

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos, nomeadamente dos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Estes compostos químicos apresentam toxicidade para humanos e animais podendo provocar doenças graves ou levar à morte (1,2). A exposição a estes contaminantes químicos ocorre, sobretudo, através da ingestão de alimentos contaminados, pelo que foram estabelecidos limites máximos para a sua ocorrência em géneros alimentícios, na União Europeia (3). Afetam, ainda, a homeostase intestinal através do comprometimento da integridade da barreira epitelial intestinal por interferência com as proteínas que constituem as junções de oclusão (claudina-3, claudina-4 e ZO-1) provocando danos nas junções entre as células, e tornando o organismo mais suscetível ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais e alergias alimentares, particularmente em populações vulneráveis como os idosos, grávidas e crianças (4-6). A aflatoxina B₁ (AFB₁) é o carcinógeno mais potente conhecido devido à sua elevada hepatotoxicidade em mamíferos, estando por isso incluída no grupo 1 (compostos com efeito carcinogénico para humanos), segundo a classificação da Agência Internacional para a Investigação do Cancro (7). Esta micotoxina apresenta também propriedades mutagénicas, teratogénicas e imunossupressoras sendo o fígado, o principal órgão alvo (1,8). Ensaios de toxicidade efetuados em ratos expostos a AFB₁ revelaram inibição do crescimento, danos no fígado e rins assim como alterações na microbiota intestinal, podendo produzir também efeitos imunotóxicos (8). Embora não esteja descrita uma associação direta, tem sido sugerida uma possível interligação entre a exposição crónica a micotoxinas e a ocorrência de várias doenças inflamatórias intestinais crónicas como a doença Crohn, colite ulcerosa, doença celíaca e síndrome do intestino irritável (4-6).

Em Portugal, a exposição à AFB₁ através do consumo de cereais é considerada uma preocupação acrescida para a saúde das crianças até aos 3 anos, em particular, as que consomem elevadas quantidades deste grupo de alimentos (9,10). Também, a AFB₁ tem a capacidade de atravessar a placenta e de ser transferida para o feto durante a gestação, tornando-o suscetível aos potenciais efeitos decorrentes desta

exposição (11,12). No âmbito do projeto earlyMYCO foi recentemente demonstrado, em ratos, que a exposição à AFB₁, durante a gravidez, promoveu alterações no sistema imunitário e na microbiota intestinal aumentando a suscetibilidade de infeção da descendência (13).

Face ao seu impacto na saúde e perspetivando-se um aumento de exposição humana a esta micotoxina, devido à subida da temperatura decorrente das alterações climáticas que favorecem o desenvolvimento de fungos toxigénicos (14,9), torna-se importante estudar o processo de absorção e transporte desta micotoxina, contribuindo para esclarecer possíveis fatores que possam estar envolvidos neste processo.

Como referido acima, a disrupção da integridade da barreira intestinal pode estar associada a uma maior suscetibilidade para múltiplas doenças. Existem ainda poucos estudos utilizando estes modelos *in vitro* para avaliar os efeitos decorrentes da exposição à AFB₁, nos vários níveis da barreira intestinal, nomeadamente no muco e epitélio, como revisto por Serrenho *et al* (12). Assim, neste estudo, utilizou-se o modelo de culturas de células Caco-2 e o modelo de coculturas com as células HT29-MTX-E12 (produtoras de muco), por forma a mimetizar, de forma mais eficiente, os resultados *in vivo*. As células Caco-2 apresentam algumas limitações como é o caso da expressão excessiva de junções de oclusão em células polarizadas, o que provoca um aumento dos valores de resistência elétrica transepitelial (TEER) face ao que se verifica no intestino humano (15,16). A cocultura de células Caco-2/HT29-MTX-E12 apresenta valores de TEER mais baixos e possuem a capacidade de produzir muco (16). O muco corresponde ao segundo nível de proteção da barreira intestinal, é constituído por mucinas (MUC) e péptidos antimicrobianos (AMPs), produzidos pelas células caliciformes e pelas células de Paneth, respetivamente, cuja função consiste em impedir que as bactérias luminais estabeleçam um contacto direto com o epitélio (6,12).

A monitorização das propriedades da barreira epitelial das culturas *in vitro* pode ser feita quer através da medição da TEER das monocamadas polarizadas, quer através da avaliação da morfologia celular por microscopia. Neste último caso, a obtenção de imagens de alta resolução de microscopia confocal de fluorescência é geralmente o método mais informativo. Esta



técnica remove a maior parte do ruído ótico do plano focal permitindo a aquisição sequencial de seções óticas em amostras de vários micron de espessura, como as monocamadas de células polarizadas (19). Estas podem ser posteriormente agrupadas, permitindo a reconstrução tridimensional da topografia da monocamada epitelial, bem como da integridade das estruturas marcadas com fluorescência (20). Neste sentido, esta metodologia tem sido usada na avaliação de alterações estruturais e quantificação do transporte de componentes biológicos através do epitélio intestinal (21). No caso dos estudos que incidem sobre a exposição de células intestinais a micotoxinas, esta técnica permite comparar a expressão das junções oclusivas, assim como a integridade das células epiteliais em células expostas e não expostas (22-24).

_Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição de células intestinais à micotoxina AFB₁, nomeadamente, na integridade e morfologia das células intestinais e o papel do muco enquanto barreira protetora, em culturas de células Caco-2 e coculturas de células Caco-HT29-MTX-E12.

_Materiais e métodos

Linhas celulares e condições de cultura: Foram utilizadas as linhas celulares de cancro de cólon humano, Caco-2 (ATCC HTB-37) e HT29-MTX-E12 (ATCC 12040401), gentilmente cedidas pelo Departamento de Genética do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Estas foram mantidas em cultura separadamente nas condições descritas por Díaz, *et al.* (25).

Desenvolvimento da monocamada e integridade da barreira intestinal: As culturas de células Caco-2 e coculturas Caco-2/HT29-MTX-E12, foram semeadas individualmente e na proporção 9:1, respetivamente, em placas de *transwell* numa concentração final de 1×10^5 células/cm². As células permaneceram em cultura durante 21 dias, sendo o desenvolvimento da monocamada celular e a integridade da barreira epitelial intestinal avaliadas através de leituras regulares dos valores de TEER (que deveriam ser superiores a $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$, de forma a garantir a polarização das células e a formação de uma barreira epitelial íntegra) (25).

Ensaio de exposição a AFB₁: As culturas de células Caco-2, individuais e em cocultura com HT29-MTX-E12 (21 dias), foram

expostas em placas de *transwell* a $1,6 \mu\text{M}$ de AFB₁, concentração próxima do valor de IC₁₀ (concentração inibitória em que ocorre 10% de mortalidade celular) (25), durante cinco tempos de incubação: 1 h, 2 h, 3 h, 6 h e 24 h. Foram registados os valores de resistência elétrica transepitelial (TEER) ao longo do tempo. Os ensaios foram efetuados em duplicado e determinados os valores médios de TEER.

Microscopia de Imunofluorescência Confocal: As monocamadas de células polarizadas em membranas de policarbonato (PC) foram lavadas em PBS, imediatamente fixadas com formaldeído e permeabilizadas com Triton X-100. Posteriormente foi efetuada uma etapa de incubação com faloidina-TRITC, sendo as células novamente lavadas em PBS. De seguida, as células foram brevemente coradas com DAPI (diamidino-2-fenilindol), lavadas novamente e fixadas com formaldeído. As membranas foram posteriormente montadas em lâminas de vidro em VectaShield, cobertas com lamelas e seladas com verniz. As linhas de laser de 405 nm e 532 nm de um microscópio confocal Leica TCS-SPE foram usadas para adquirir secções XY de um Airy de espessura separadas por 250 nm ao longo do eixo Z, por forma a formar uma pilha de imagens que permitissem reconstruir as monocamadas de células polarizadas no volume XYZ. As imagens gravadas foram processadas com o *software* embutido Leica e montadas em figuras com o *software* Adobe Photoshop (26).

_Resultados e discussão

Desenvolvimento da monocamada e integridade da barreira intestinal

O gráfico 1 representa a evolução dos valores de resistência elétrica transepitelial (TEER), das culturas Caco-2, individuais e em cocultura, ao longo do desenvolvimento da monocamada celular. Foram registados valores superiores a $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ entre os 15 e 21 dias de crescimento, para ambas as culturas, o que corresponde a uma membrana polarizada (22,27-30). As diferenças entre valores de TEER para as culturas ensaiadas foram significativas para os 4, 6, 13 e 21 dias de crescimento, sendo os valores de TEER da cocultura superiores aos das células individuais nos dois últimos dias referidos e inferiores para os restantes. Os dias 18 e 20, apresentam também valores de TEER inferiores nas coculturas, mas não significativos.



Vários autores descrevem que as coculturas de células Caco-2/HT29-MTX-E12, produtoras de muco apresentam um decréscimo dos valores de TEER, comparativamente às células Caco-2 individuais, permitindo assim obter uma monocamada mais permeável e com junções de oclusão mais próximas das encontradas no intestino humano (27,28,31). O crescimento ideal para efetuar ensaios de exposição, parece assim, situar-se até aos 21 dias.

Ensaio de exposição a Aflatoxina B₁ (AFB₁)

Os resultados expressos no gráfico 2 (a,b) revelam uma diminuição dos valores de TEER para as células Caco-2, individuais e em cocultura com HT29-MTX-E12, em função do tempo de exposição à AFB₁, em relação aos controlos (não expostos à micotoxina), apresentando diferenças significativas em todos os tempos de exposição (1 h, 2 h, 3 h, 6 h e 24 h). No entanto, salienta-se que, em termos absolutos, o decréscimo na TEER foi claramente menor nas condições de cocultura. De facto, o valor de TEER para a monocultura de células Caco-2 desceu até aos 282,3 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (às 6 h de exposição), enquanto no caso da cocultura Caco-2/HT29-MTX-E12 o valor de TEER não baixou dos 498,5 $\Omega \cdot \text{cm}^2$, (que foi registado às 3 h de exposição). Curiosamente, em ambos os casos, observou-se uma ligeira recuperação do valor de TEER às 24 h. Estes resultados (com exceção da subida dos valores de TEER registada às 24 h) estão de acordo com os resultados descritos na bibliografia, visto que também

se verificou uma redução dos valores de TEER nos trabalhos consultados (29,30,32). Gratz, S. *et al.* (2007) (29) e Romero, A. *et al.* (2016) (32) demonstraram que ao expor as células Caco-2 a concentrações entre 100 e 150 μM de AFB₁ ocorria uma descaída significativa dos valores de TEER, situada entre os 9% e 31,1%, durante 24 h de exposição (27,29). Sobral, M.M.C. *et al.* (2019) (30) também realizaram estudos de transporte com células Caco-2 e AFB₁, usando a mesma concentração deste estudo (1,6 μM), no entanto, não foram encontradas diferenças significativas nos valores da TEER após 3 h de exposição para esta concentração de AFB₁. Apesar de não existir bibliografia disponível sobre o efeito da AFB₁ em coculturas de células Caco-2/HT29-MTX, existem dois estudos de Huang, X. *et al.* (2019) (33) e Wu, C.Q. *et al.* (2020) (34) sobre os efeitos do metabolito da AFB₁, aflatoxina M₁ (AFM₁) nestas coculturas. Verificou-se que ao expor as culturas de células Caco-2 e as coculturas Caco-2/HT29-MTX-E12 à AFM₁ (0,16-12 μM), ocorria uma redução significativa dos valores de TEER após 48 h de exposição, para as células Caco-2, enquanto que para a cocultura se verificou uma redução não significativa desses valores (33,34). Isto é consistente com a nossa observação de que, independentemente do tempo de exposição aos 1,6 μM de AFB₁, a redução na TEER é claramente menor nas condições de cocultura, podendo o efeito estar associado à presença de muco que, como argumentam estes autores (33,34), pode atuar como uma barreira protetora mantendo a integridade da monocamada epitelial.

Gráfico 1: ↓ Valores de resistência elétrica transepitelial (TEER) relativos às culturas celulares Caco-2 e às coculturas Caco-2/HT29-MTX-E12 ao longo dos 21 dias de crescimento da monocamada celular.

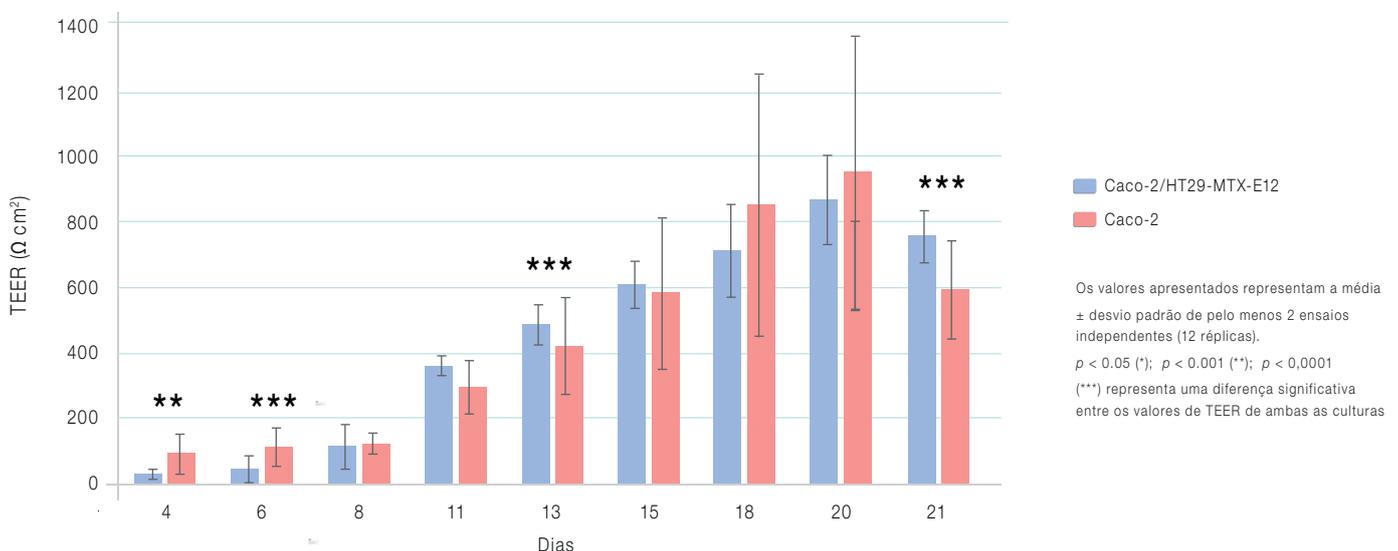
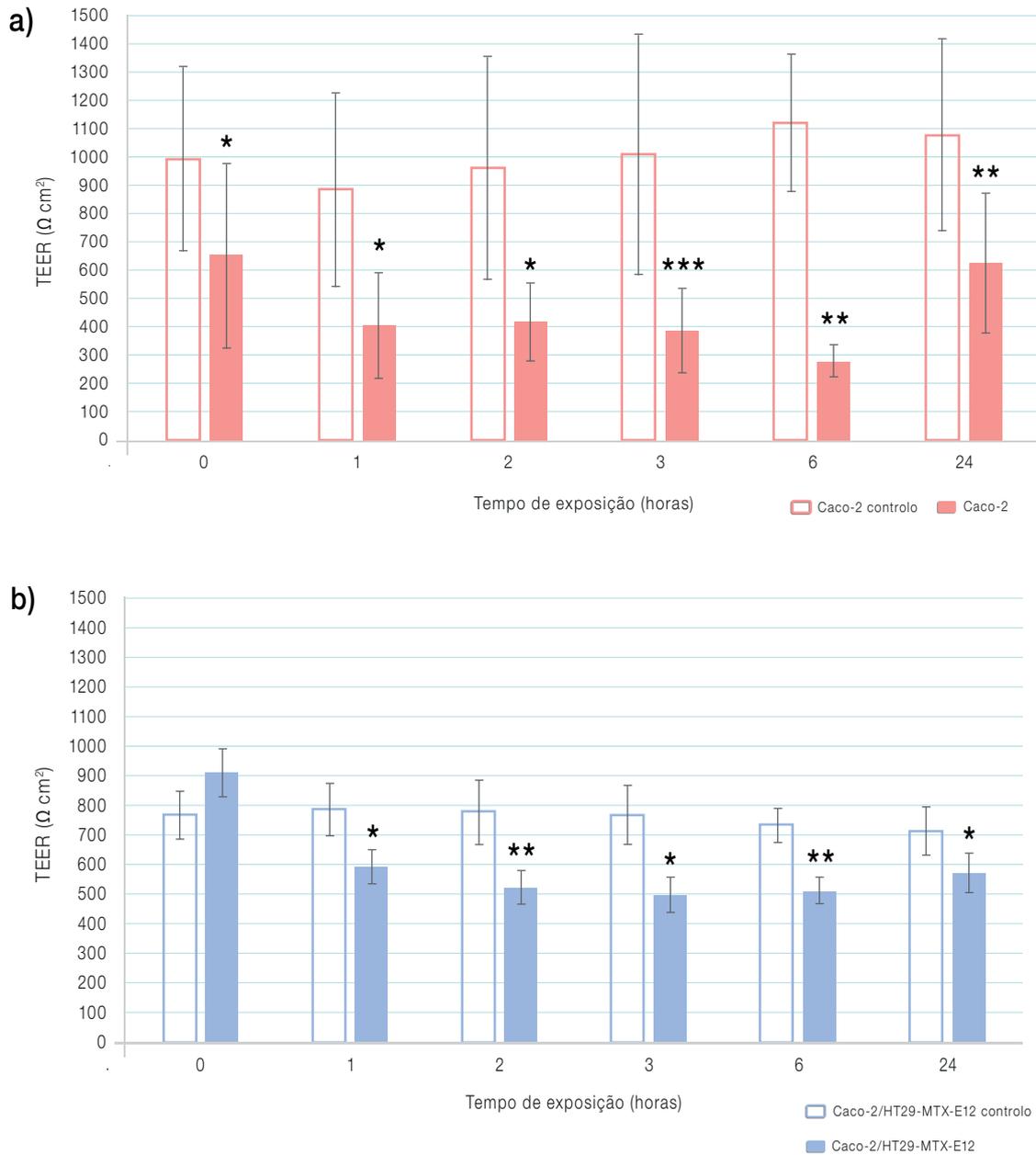


Gráfico 2: ↓ Integridade da monocamada celular exposta a AFB₁ (1,6 μM) durante 24 h.



Representação dos valores da resistência elétrica transepitelial (TEER) em função do tempo (0 h-24 h) das culturas e coculturas expostas a 1,6 μM de AFB₁.
a) comparação dos valores da TEER entre as células Caco-2 expostas a AFB₁ e não expostas (controle).
b) comparação dos valores da TEER entre as células Caco-2/HT29-MTX-E12 expostas a AFB₁ e não expostas (controle).
Os valores apresentados representam a média ± desvio padrão de pelo menos 3 ensaio independente (n=3, 2 réplicas).
p < 0.05 (*); p < 0.001 (**); p < 0,0001; (***) representa uma diferença significativa entre os valores do controle e das células expostas.

Microscopia de Imunofluorescência Confocal

A **figura 1** representa os resultados obtidos no ensaio de microscopia de imunofluorescência confocal antes e depois de exposição à micotoxina AFB₁. A **figura 1a** e **1c**, correspondem a células Caco-2 e Caco-2/HT29-MTX-E12 não expostas à AFB₁, respetivamente. Estas apresentam anéis de actina cortical bem definidos, marcados a vermelho com a faloidina ao longo de toda a periferia das células. Os núcleos marcados a azul, com DAPI, permitem identificar cada célula da monocamada. No caso das coculturas, estão presentes as duas populações de células Caco-2 e HT29-MTX-E12, sendo que as últimas apresentam uma maior dimensão, e uma morfologia menos cuboide do que as Caco-2 (aspetos evidenciados pelas vistas laterais que documentam as monocamadas no plano XZ), com formação de regiões de marcação mais difusa indicativas da presença de muco (representadas mais claramente no corte XY da **figura 1d**). Durante um período de 3 h de exposição à AFB₁, verificou-se que as células Caco-2 (**figura 1b**) e as Caco-2/HT29-MTX-E12 (**figura 1d**) apresentam diferenças na morfologia do anel cortical de actina, sendo estas diferenças mais evidentes no caso das monoculturas Caco-2. A principal diferença que se observa é a morfologia intermitente dos filamentos de actina. Observou-se ainda a ocorrência destes aspetos intermitentes ao longo do anel cortical de ambas as populações celulares (Caco-2 e HT29-MTX-E12 - representado pelas setas brancas). Estas falhas no anel cortical estão geralmente associadas à perda das

junções de oclusão entre células polarizadas adjacentes (35), o que irá provocar um aumento da permeabilidade epitelial que, por sua vez, irá permitir que ocorra uma maior translocação de agentes patogénicos (4). Na bibliografia, não se identificaram estudos sobre diferenças morfológicas entre culturas de células Caco-2 e coculturas de células Caco-2/HT29-MTX-E12, antes e após a exposição à AFB₁, no entanto, o mesmo foi descrito para os efeitos de outras micotoxinas na parede da monocamada celular (29,33,23). Gao, Y. *et al.* (2018) (23) demonstraram que a síntese de alguns dos componentes das junções oclusivas (claudina-3, claudina-4 e ZO-1) foi severamente afetada nas células expostas a concentrações citotóxicas de AFM₁ e OTA (Ocratoxina A) (23). Já Pinton, P. *et al.* (2009) (22) demonstraram que a micotoxina DON (Desoxinivalenol) tem a capacidade de reduzir a intensidade da coloração para a claudina-4 nas células Caco-2, sugerindo que estas foram removidas do complexo das junções oclusivas das células expostas (22). No caso das coculturas, Huang, X. *et al.* (2019) (33) verificaram que ao expor as células a uma mistura de AFM₁+OTA (Aflatoxina M₁ e Ocratoxina A) (0,013 µM), as junções oclusivas apresentavam-se significativamente danificadas e que o número de células viáveis diminuiu bastante, o que produziu uma redução no número de células produtoras de muco causando também alterações na produção das mucinas (danos no epitélio e muco) (33,34).

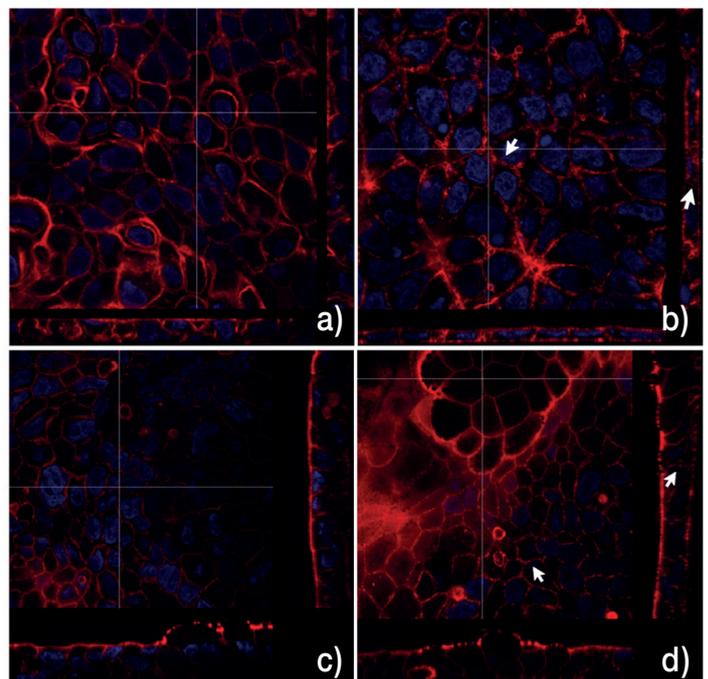
Figura 1: ➔ Efeitos da AFB₁ nas morfologias das células Caco-2 individuais e em cocultura.

Fotografias obtidas através de microscopia de imunofluorescência confocal antes e após 3 h de exposição a AFB₁:

- a) células Caco-2 não expostas a AFB₁ (controlo);
- b) células Caco-2 após 3 h de exposição a AFB₁;
- c) células Caco-2/HT29-MTX-E12 não expostas a AFB₁ (controlo);
- d) células Caco-2/HT29-MTX-E12 após 3 h de exposição a AFB₁.

Setas indicam as mudanças na morfologia das células expostas a 1,6 µM de AFB₁.

- Filamentos de actina marcados a vermelho (Faloidinia);
- Núcleos das células marcados a azul (DAPI)





_Conclusões

Até ao momento, este é o primeiro estudo que aborda os efeitos tóxicos da AFB₁ em coculturas de células Caco-2/HT29-MTX-E12.

A monitorização do desenvolvimento da monocamada celular e avaliação da integridade da barreira intestinal das culturas de células Caco-2 ensaiadas individualmente e Caco-2/HT29-MTX-E12, permitiu concluir que após 21 dias, ambas as culturas conseguem formar uma monocamada de células polarizada, logo com as características de permeabilidade que ocorrem no intestino. A exposição das culturas intestinais polarizadas à micotoxina AFB₁, confirmaram os seus efeitos lesivos na barreira intestinal tanto a nível da integridade da membrana como a nível morfológico, mesmo em baixas concentrações (1,6 µM), registando-se um decréscimo dos valores de TEER ao longo do tempo de incubação (0-6 h).

Os ensaios comparativos de exposição à AFB₁, com ambas as culturas, revelaram valores de TEER superiores para as coculturas de células Caco-2, sempre equivalentes ou superiores ao valor esperado para monocamadas íntegras de células polarizadas (500 Ω*cm²). Este efeito é fortemente sugestivo do papel do muco na proteção do epitélio e no reforço da barreira epitelial. Será necessário avaliar posteriormente qual o efeito destas coculturas no transporte da AFB₁ usando metodologias analíticas que possam avaliar as toxinas nas amostras colhidas nas zonas apicais e basolaterais e eventuais metabolitos.

Futuramente, será importante avaliar a interação da micotoxina com o muco, tendo em consideração outros indicadores como a composição do muco – diferentes tipos de mucinas e a sua abundância, pois apesar de existir informação sobre o efeito das micotoxinas em ensaios *in vivo* e em órgãos específicos como o fígado e no sistema imunitário, a bibliografia disponível relacionada com os efeitos das micotoxinas no trato gastrointestinal é ainda limitada não sendo claras as consequências que as alterações do muco provocadas por micotoxinas podem trazer para a saúde do indivíduo e da microbiota intestinal.

Os resultados pormenorizados deste trabalho estão compilados numa tese de mestrado desenvolvida no Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (36).

Financiamento:

Os autores agradecem à FCT/MCTES pelo financiamento com fundos nacionais relativos ao projeto earlyMYCO (PTDC/MED-TOX/28762/2017) e ao CESAM (UIDP/50017/2020 +UIDB/50017/2020+LA/P/0094/ 2020).

Referências bibliográficas:

- (1) Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev.* 2003 Jul;16(3):497-516. <https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.20>
- (2) Alvito P. Alterações do Estado de Saúde Associadas à Alimentação Contaminação Química – Micotoxinas. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2014. <http://hdl.handle.net/10400.18/2757>
- (3) União Europeia. Regulamento (UE) 2023/915 Da Comissão de 25 de abril de 2023 relativo aos teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios e que revoga o Regulamento (CE) n.º 1881/2006. JO 5.5.2023:L 119/103-157. <http://data.europa.eu/eli/reg/2023/915/oj>
- (4) Akbari P, Braber S, Varasteh S, et al. The intestinal barrier as an emerging target in the toxicological assessment of mycotoxins. *Arch Toxicol.* 2017 Mar;91(3):1007-29. Epub 2016 Jul 14. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1794-8>
- (5) Maresca M, Fantini J. Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicol.* 2010 Sep 1;56(3):282-94. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2010.04.016>
- (6) Gao Y, Meng L, Liu H, et al. The Compromised Intestinal Barrier Induced by Mycotoxins. *Toxins (Basel).* 2020 Sep 28;12(10):619. <https://doi.org/10.3390/toxins12100619>.
- (7) International Agency for Research on Cancer. Chemical agents and related food occupations: a review of human carcinogens. Lyon: IARC, 2012. (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans; 100F). <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>
- (8) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Schrenk D, Bignami M, Bodin L, et al. Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA J.* 2020 Mar 9;18(3):e06040. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6040>
- (9) Assunção R, Martins C, Vasco E, et al. Portuguese children dietary exposure to multiple mycotoxins - An overview of risk assessment under MYCOMIX project. *Food Chem Toxicol.* 2018 Aug;118:399-408. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.040>.
- (10) Alvito P, Bastos-Amador P, Duarte EL, et al. Exposição precoce a micotoxinas: o contributo dos projetos MYCOMIX e EarlyMYCO. *Boletim Epidemiológico Observações.* 2020;9(27):12-16. <https://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7235>
- (11) Partanen HA, El-Nezami HS, Leppänen JM, et al. Aflatoxin B1 transfer and metabolism in human placenta. *Toxicol Sci.* 2010 Jan;113(1):216-25. Epub 2009 Oct 29. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfp257>
- (12) Serrenho I, Assunção R, Alvito P. Exposição do trato gastrointestinal à aflatoxina B1: um impacto negligenciado? *Boletim Epidemiológico Observações.* 2021;10(30):39-45. <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/7772>
- (13) Bastos-Amador P, Duarte EL, Torres J, et al. Maternal dietary exposure to mycotoxin aflatoxin B1 promotes intestinal immune alterations and microbiota modifications increasing infection susceptibility in mouse offspring. *Food Chem Toxicol.* 2023 Mar;173:113596. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113596>
- (14) Battilani P, Toscano P, Van der Fels-Klerx HJ, et al. Aflatoxin B1 contamination in maize in Europe increases due to climate change. *Sci Rep.* 2016 Apr 12;6:24328. <https://doi.org/10.1038/srep24328>



- (15) Pan F, Han L, Zhang Y, et al. Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(6):680-5. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792>
- (16) Fedi A, Vitale C, Ponschin G, et al. In vitro models replicating the human intestinal epithelium for absorption and metabolism studies: A systematic review. *J Control Release.* 2021 Jul 10;335:247-68. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.028>
- (17) Xu Y, Shrestha N, Pr at V, et al. An overview of in vitro, ex vivo and in vivo models for studying the transport of drugs across intestinal barriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021 Aug;175:113795. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.05.005>
- (18) Huang X, Gao Y, Li S, et al. Modulation of Mucin (MUC2, MUC5AC and MUC5B) mRNA Expression and Protein Production and Secretion in Caco-2/HT29-MTX Co-Cultures Following Exposure to Individual and Combined Aflatoxin M1 and Ochratoxin A. *Toxins (Basel).* 2019 Feb 23;11(2):132. <https://doi.org/10.3390/toxins11020132>
- (19) Wu C, Gao Y, Li S, et al. Modulation of intestinal epithelial permeability and mucin mRNA (MUC2, MUC5AC, and MUC5B) expression and protein secretion in Caco-2/HT29-MTX co-cultures exposed to aflatoxin M1, ochratoxin A, and zearalenone individually or collectively. *Toxicol Lett.* 2019 Jul;309:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.010>
- (20) Rusticeanu M, Zimmer V, Lammert F. Visualising and quantifying intestinal permeability -where do we stand. *Ann Hepatol.* 2021 Jul-Aug;23:100266. Epub 2020 Oct 10. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.09.010>
- (21) Weller A, Hansen MB, Marie R, et al. Quantifying the transport of biologics across intestinal barrier models in real-time by fluorescent imaging. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Sep 9;10:965200. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.965200>
- (22) Pinton P, Nougayr de JP, Del Rio JC, et al. The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 May 15;237(1):41-8. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.03.003>
- (23) Gao Y, Li S, Wang J, et al. Modulation of Intestinal Epithelial Permeability in Differentiated Caco-2 Cells Exposed to Aflatoxin M1 and Ochratoxin A Individually or Collectively. *Toxins (Basel).* 2017 Dec 27;10(1):13. <https://doi.org/10.3390/toxins10010013>
- (24) Gagnon M, Zihler Berner A, Chervet N, et al. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate Salmonella adhesion and invasion. *J Microbiol Methods.* 2013 Sep;94(3):274-9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.06.027>
- (25) D az, IP. Effects of the Co-Administration of Patulin and Cysteine on the Integrity of Caco-2 Cells Monolayer, Wageningen University, 2009.
- (26) Pereira JFS, Bessa C, Matos P, et al. Pro-Inflammatory Cytokines Trigger the Overexpression of Tumour-Related Splice Variant RAC1B in Polarized Colorectal Cells. *Cancers (Basel).* 2022 Mar 9;14(6):1393. <https://doi.org/10.3390/cancers14061393>
- (27) Pan F, Han L, Zhang Y, et al. Optimization of Caco-2 and HT29 co-culture in vitro cell models for permeability studies. *Int J Food Sci Nutr.* 2015;66(6):680-5. <https://doi.org/10.3109/09637486.2015.1077792>
- (28) B duneau A, Tempesta C, Fimbel S, et al. A tunable Caco-2/HT29-MTX co-culture model mimicking variable permeabilities of the human intestine obtained by an original seeding procedure. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014 Jul;87(2):290-8. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.017>
- (29) Gratz S, Wu QK, El-Nezami H, et al. Lactobacillus rhamnosus strain GG reduces aflatoxin B1 transport, metabolism, and toxicity in Caco-2 Cells. *Appl Environ Microbiol.* 2007 Jun;73(12):3958-64. <https://doi.org/10.1128/AEM.02944-06>
- (30) Sobral MMC, Faria MA, Cunha SC, et al. Transport of mycotoxins across human gastric NCI-N87 and intestinal Caco-2 cell models. *Food Chem Toxicol.* 2019 Sep;131:110595. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110595>
- (31) Markus J, Landry T, Stevens Z, et al. Human small intestinal organotypic culture model for drug permeation, inflammation, and toxicity assays. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2021 Feb;57(2):160-173. Epub 2020 Nov 25. <https://doi.org/10.1007/s11626-020-00526-6>
- (32) Romero A, Ares I, Ramos E, et al. Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: Protective effect of illite mineral clay. *Toxicology.* 2016 Apr 15;353-354:21-33. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.05.003>
- (33) Huang X, Gao Y, Li S, et al. Modulation of Mucin (MUC2, MUC5AC and MUC5B) mRNA Expression and Protein Production and Secretion in Caco-2/HT29-MTX Co-Cultures Following Exposure to Individual and Combined Aflatoxin M1 and Ochratoxin A. *Toxins (Basel).* 2019 Feb 23;11(2):132. <https://doi.org/10.3390/toxins11020132>
- (34) Wu C, Gao Y, Li S, et al. Modulation of intestinal epithelial permeability and mucin mRNA (MUC2, MUC5AC, and MUC5B) expression and protein secretion in Caco-2/HT29-MTX co-cultures exposed to aflatoxin M1, ochratoxin A, and zearalenone individually or collectively. *Toxicol Lett.* 2019 Jul;309:1-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.03.010>
- (35) Raman R, Pinto CS, Sonawane M. Polarized Organization of the Cytoskeleton: Regulation by Cell Polarity Proteins. *J Mol Biol.* 2018 Sep 28;430(19):3565-3584. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.06.028>
- (36) Serrenho, In s B. Efeitos da Aflatoxina B1 nos Modelos de Culturas e Co-culturas Celulares Caco-2 e Caco-2/HT29-MTX-E12. (Disserta o de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, Faculdade de Ci ncias da Universidade de Lisboa, 2022). <http://hdl.handle.net/10451/58013>