

Ação Imunomodulatória de Micotoxinas sobre Células Esplênicas de Mamíferos

MARTORELLI, R.A.^{1*}; FREIRE, R.B.² & AMENDOEIRA, M.R.R.³

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de demonstrar os efeitos causados pela associação de ocratoxina A, aflatoxina B1, citrinina e fumonisina B1 sobre o sistema imunitário de mamíferos, a fim de determinar se estes metabólitos fúngicos poderiam agir como imunomoduladores. Camundongos suíços albinos jovens, previamente imunizados com uma suspensão de hemáceas de carneiro (SRBC), foram usados como doadores de células esplênicas. Os esplenócitos foram expostos à centésima parte da DL50% de cada micotoxina, durante quatro horas. A produção de anticorpos *in vitro* foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de placas hemolíticas (UFP). Os resultados obtidos quando da associação das micotoxinas estudadas sugerem uma significativa diminuição na produção de anticorpos *in vitro*.

Considerando-se que a fumonisina B1 apresenta uma diferente atividade metabólica, experimentos contendo apenas esta micotoxina foram realizados, revelando uma intensa exacerbação da resposta humoral.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, há um crescente interesse em fungos que infectam e produzem metabólitos tóxicos em grãos e cereais consumidos pelo homem e animais de criação. Estas espécies toxigênicas podem sobreviver às condições do estoque, assim como seus metabólitos, que se mantêm estáveis, permanecendo nos alimentos e ração animal (Magnoli, C.E. *et al*, 1999).

Com o desenvolvimento de modernos métodos agrícolas e os processamentos em larga escala, exacerbou-se o problema, resultando tanto em doenças agudas denominadas micotoxicoses, como em condi-

ções crônicas não reconhecidas como tendo envolvimento com micotoxinas (Dutton, M.F. *et al*, 1996).

Muitas micotoxinas têm sido encontradas em uma grande variedade de alimentos. O efeito da ingestão de micotoxinas associadas ainda é largamente desconhecido, uma vez que a maioria dos estudos toxicológicos feitos em animais utilizam micotoxinas isoladas. Além disso, os níveis de micotoxinas administrados são geralmente maiores do que os naturalmente encontrados nos alimentos (Trucksess, M.W., 2000).

As micotoxinas como agentes imunossupressores causam bloqueio na resistência natural e adquirida a doenças infecciosas (Herzog-Soares, 1994). O consumo destas micotoxinas, em níveis insuficientes para a determinação de intoxicações agudas com manifestações clínicas, suprime a função imunológica, diminuindo a resistência a infecções.

Até o presente momento, micotoxinas com potencial carcinogênico em modelos animais incluem aflatoxinas, esterigmatocistina, ocratoxina, fumonisinas, zearalenona e algumas toxinas penicílicas. A maioria destas micotoxinas carcinogênicas age como genotóxicos, com exceção das fumonisinas, as quais acredita-se que interrompem as vias de transmissão entre as células alvo (Wang, J.S. & Groopman, J.D., 1998). As fumonisinas estão relacionadas com leucoencefalomalácia equina, síndromes de edema pulmonar em suínos, além de estarem estatisticamente correlacionados com câncer de esôfago em humanos (Castelá, G. *et al*, 1996).

Sabe-se atualmente, que as micotoxinas causam vários tipos de câncer, mutagênese, atrofia de testículos e sérios distúrbios no fígado e rins. Estas substâncias entram na cadeia alimentar e, associadas a medicamentos, ou com outros agentes patogênicos, tornam difícil a caracterização das micotoxicoses, pois efeitos clínicos decorrentes da intoxicação, confundem-se com deficiências alimentares, distúrbios metabólicos ou doenças infecciosas primária e secundária. Além disso, o consumo em níveis que não causam micotoxicose clínica, suprimem funções imunitárias, diminuindo a resistência a agentes infecciosos (Corrier, 1991).

Uma vez que no Brasil há uma grande diversidade de cepas de fungos produtores de micotoxinas, é de vital importância avaliar a ação das micotoxinas sobre o sistema imunológico de animais de criação, utilizando camundongos como modelo experimental de mamífero.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos albinos suíços (SW), machos e fêmeas, oriundos do biotério do laboratório de Imunologia da UFRRJ, com aproximadamente duas semanas de vida, foram previamente estimulados com inoculações intraperitoneais de 0,5 ml de suspensão de eritrócitos de carneiro a 2,5%. Dez dias após a inoculação, estes animais foram sacrificados e utilizados como doadores de células esplênicas, as quais foram cultivadas em meio completo RPMI 1640, acondicionadas em garrafas de cultivo celular, e expostas à centésima parte da DL50% de cada micotoxina, por 4 horas a 37°C e 5% de CO₂, em estufa umidificada.

As micotoxinas foram obtidas comercialmente de distribuidor Sigma Chemicals Co. (St. Louis, USA). As soluções de aflatoxina B1, fumonisina B1, ocratoxina A e citrinina contendo 10 mg foram diluídas imediatamente antes do uso em salina tamponada (PBS). A partir desta concentração, foram feitas diluições sucessivas, chegando-se às concentrações finais de 0,01 ml/ml de citrinina, 0,04 ml/ml de aflatoxina B1, 0,05 ml/ml de fumonisina B1 e 0,04 ml/ml de ocratoxina A. As toxinas fúngicas foram solubilizadas em tampão carbonato-bicarbonato 1M, pH: 9,0 e esterilizadas por filtração em membrana Millipore (0,22 micra), acondicionadas em frascos estéreis e armazenadas em freezer a 20°C negativos.

O sistema experimental foi adicionado de eritrócitos de carneiro (SRBC) e componentes do sistema complemento através do soro sanguíneo de animal adulto sadio.

A produção de anticorpos *in vitro*, foi avaliada pela contagem visual de unidades formadoras de placas hemolíticas (UFP), segundo metodologia descrita por Hudson & Hay, 1991.

A viabilidade celular foi avaliada através da técnica de exclusão de Azul de Tripán. As células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer, no retículo próprio para contagem de leucócitos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a associação de aflatoxina B1, citrinina, fumonisina B1 e ocratoxina A, causaram uma diminuição da produção de anticorpos *in vitro* de aproximadamente 50%, com relação aos grupos controle não intoxicados.

Existem vários trabalhos reportando a atividade de micotoxinas diversas (aflatoxina, fumonisina, toxina T2, roridina A, entre outras) sobre as células T.

Cruz e colaboradores (1996) relatam que outras micotoxinas podem determinar a morte prematura de células imunocompetentes, podendo provocar alterações celulares compatíveis com a apoptose. Estes

fatos reforçam a idéia de que os fagócitos circulantes são as primeiras células a serem afetadas por pequenas doses da mistura de micotoxinas estudadas. Sua disfunção pode determinar estados de imunossupressão variados (Corrier, 1991).

O efeito supressivo pode estar relacionado a uma ação tóxica aos níveis de membrana e síntese celular. Porém, a atividade imunomodulatória não está relacionada com o mesmo mecanismo para todas as micotoxinas, mas, de um modo geral, estão relacionadas com danos diretos sobre a membrana celular, e com a diminuição da secreção de citocinas, necessárias para o estabelecimento de uma resposta efetiva contra agentes infecciosos (Herzog-Soares, 1997).

As fumonisinas têm sido foco de estudos nos últimos anos, uma vez que sua toxicidade e potencial carcinogênico são relacionados com sua habilidade em inibir a ceramida sintetase, uma enzima fundamental no metabolismo dos esfingolipídeos complexos. A inibição desse mecanismo em cultura de células ou *in vivo* resultam na redução de esfingolipídeos complexos, aumentando concentrações intracelulares de esfinganina livre e produtos de clivagem (Pelagalli, A. *et al.*, 1999). Como os esfingolipídeos desempenham papel fundamental na regulação da proliferação celular, uma diferenciação ou transformação de seu metabolismo, tem sido postulado como sendo o mecanismo de toxicidade e carcinogênese das fumonisinas (Riley, R.T., *et al.*, 1996).

Por diferenças estruturais e funcionais entre a fumonisina B1 e as demais micotoxinas estudadas, foram realizados experimentos com esta toxina isolada. Os resultados demonstraram que esta parece exacerbar a resposta humoral, uma vez que a produção de anticorpos foi 200% superior à produção do grupo controle.

O aumento da resposta humoral na presença de micotoxinas se faz presente em estudos de Reddy que, em 1989, reportou experimentos com camundongos, onde uma outra micotoxina (citrinina) seria um indutor, e não supressor da produção de anticorpos.

Em experimentos prévios, a adição de soro de animal adulto interferiu na ação imunomodulatória das micotoxinas, minimizando seus efeitos, porém em experimentos recentes, apenas utilizando a fumonisina B1, a adição de soro heterólogo não pareceu causar algum efeito sobre a resposta humoral.

Os resultados foram obtidos a partir de 6 repetições, e foram submetidos ao teste de Tuckey ($p < 0,01$).

Apesar de estudos na área, ainda existem muitas lacunas sobre o mecanismo de ação de cada micotoxina sobre o sistema imune, doses mínimas permissíveis, assim como suas consequências para animais e homens que ingerem constantemente alimentos contaminados por estes metabólitos tóxicos. ◆

GRÁFICO 1
EFEITO DA ASSOCIAÇÃO
DE AFLATOXINA B1,
OCRATOXINA A,
FUMONISINA B1 E
CITRININA SOBRE A
PRODUÇÃO DE
ANTICORPOS *IN VITRO*.

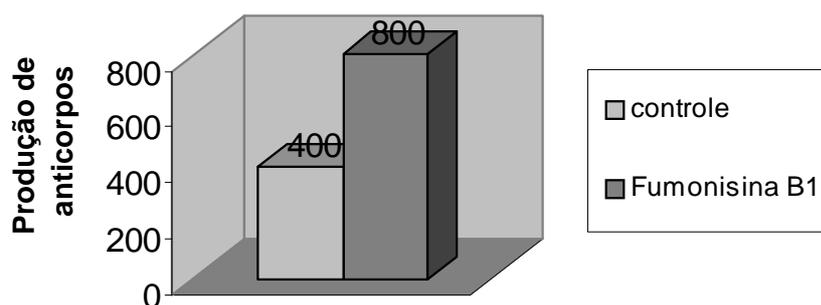
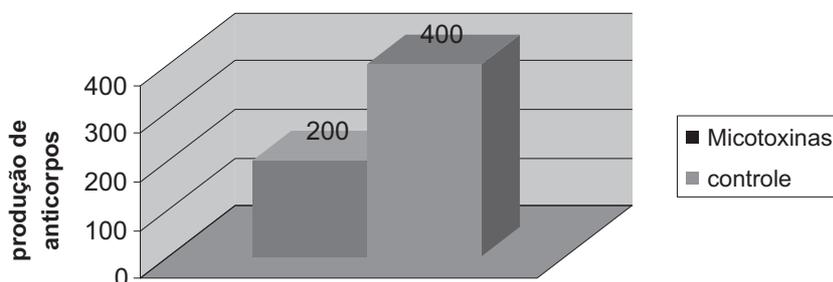


GRÁFICO 2
AÇÃO DA FUMONISINA
B1 SOBRE A RESPOSTA
HUMORAL DE
ESPLENÓCITOS DE
CAMUNDONGOS.



NOTAS DE RODAPÉ

- ¹ Doutoranda em Biologia Parasitária – Instituto Oswaldo Cruz. e-mail: romartorelli@aol.com
- ² Doutor em Parasitologia, Professor- Dep. de Imunologia e Microbiologia - UFRRJ.
- ³ Pesquisadora Titular – Dep. Protozoologia – IOC – FIOCRUZ / NUDES – Fundação Técnico-Educacional Souza Marques.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CASTELLÁ, G., BRAGULAT, M.R. & CABAÑES, F.J. **Mycoflora and fumonisin-producing strains of *Fusarium moniliforme* in mixed poultry feeds and component raw material.** Mycopathologia 133: 181-184, 1996.
- CORRIER, D. E. **Mycotoxigenesis: mechanisms of immunosuppression.** Veterinary Immunology and Immunopathology, vol. 30, p. 73-87, 1991.
- CRUZ, I. C. H.; HERZOG-SOARES, J.D.A. & FREIRE, R. B. **Can mycotoxins induce apoptosis?** IX Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. PM 104, p. 239, Rome, 23-31 ma, 1996.
- DUTTON, M.F. **Fumonisin, mycotoxins of increasing importance: Their nature and their effects.** Pharma Col. Ther. 70:137-161, 1996.
- HERZOG-SOARES, J. D. A. Efeito in vitro da citrulina sobre macrófagos peritonias de galinhas doadoras da raça Leghorn. **Tese de Mestrado em Microbiologia Veterinária**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 43 p., 1994.
- HERZOG-SOARES, J. D. A. Relação parasito-hospedeiro: ação das micotoxinas sobre a resposta imunitária para coccídeos em camundongos albinos (SW) e gatos domésticos (*Felis catus*). **Tese de doutorado em parasitologia veterinária**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 88p., 1997.
- HUDSON, L. & HAY, F. **Practical Immunology.** Blackwell Scientific Publications, 3a ed. 507 p., 1991.
- MAGNOLI, C.E., SAENZ, M.A., CHIACCHIEIRA, S.M., DALCERO, A.M. **Natural occurrence of fusarium species and fumonisin-production by toxigenic strains isolated from poultry feed in Argentina.** Mycopathologia 145: 35-41, 1999.
- PELAGALLI, A., BELISARIO, M.A., SQUILLACIOTTI, C., MORTE, R.D., d'ANGELO, D., TAFURI, S., LUCISANO, A., STAIANO, N. **The mycotoxin fumonisin B1 inhibits integrin-mediated cell-matrix adhesion.** Biochimie, 81: 1003-1008, 1999.
- REDDY, R. V., TAYLOR, M. J. & SHARMA, R. P. Evaluation of citrinin toxicity on the immune functions of mice. *Journal of Food Protection*, vol. 51, p. 32-36, 1989. RILEY, R.T., WANG, E., SCHROEDER, J.J., SMITH, E.R., PLATTNER, R.D., ABBAS, H., YOO, H.S., MERRIL, A.H.jr. **Evidence for disruption of sphingolipid metabolism as a contributing factor in the toxicity and carcinogenicity of fumonisins.** *Nat. Toxins* 4: 3-15, 1996.
- TRUCKSESS, M.W. Mycotoxins. *Journal of AOAC International*, Vol. 83, no. 2, p. 442-448, 2000.
- WANG, J.S & GROOPMAN, J.D. **DNA damage by mycotoxins.** *Mutation Research* 424: 167-181, 1999.