

Ocratoxina A, aflatoxina B1 e citrinina como agentes moduladores da produção de anticorpos em aves e mamíferos

Ochratoxin A, aflatoxin B1 and citrinin as modulators agents of antibodies production in poultry and mammalian

Rosana Alves Martorelli* e Ronald Bastos Freire*

Resumo

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de demonstrar os efeitos causados pela associação entre ocratoxina A, aflatoxina B1 e citrinina, sobre a resposta imunitária adaptativa de aves e mamíferos, a fim de determinar se estas micotoxinas poderiam levar à modulação do sistema imune. A toxicidade relativa de cada micotoxina, bem como de suas associações, foi determinada em células esplênicas de galinhas e camundongos, onde se observou a secreção primária de anticorpos (IgM) contra eritrócitos de carneiro, após quatro horas de exposição às micotoxinas. Os ensaios foram realizados na presença e na ausência de soro heterólogo proveniente de animais adultos normais, a fim de determinar possíveis interações entre o complemento presente no soro, com a ação tóxica das micotoxinas. Observou-se uma notável depressão imunológica nos grupos tratados com a associação entre citrinina e aflatoxina B1, porém, na presença de soro heterólogo, houve uma imunostimulação. Os resultados sugerem uma possível interferência de fatores inespecíficos, os quais estão presentes no soro proveniente de animais adultos normais, cuja atividade poderia amenizar ou até mesmo neutralizar a ação imunomodulatória das micotoxinas, sugerindo a possibilidade de imunoterapia.

Palavras-chave: citrinina; aflatoxina B1; ocratoxina A; imunomodulação em aves e mamíferos; imunotoxinas.

Abstract

The present paper was carried out in order to demonstrate the effects caused by the association of ochratoxin A, aflatoxin B1, citrinin over the mammalian and poultry adaptive immune response, in order to determinate if this mycotoxins could carry into a modulation of the immune system. The relative toxicity of each mycotoxin, as well as their mixtures, was determined on mice and chicken spleen cells, whose primary antibodies secretion (IgM) against sheep red blood cells, after four hours of mycotoxins exposure, was observed. The assays were done in the presence and in the absence of heterologous serum deriving from normal adults animals, in order to demonstrate the complement interaction, proceeding from the serum, over the mycotoxins immune modulatory action. A remarkable immune depression could be noticed to the groups treated with citrinin and aflatoxin A, however in heterologous serum presence, happened an immune stimulation. These results are suggestive of a possible interference of unspecific factors, which are present in heterologous serum, whose activity would soften or even neutralize mycotoxin mixture action and suggesting a possibility to immunotherapy.

Keywords: citrinin, aflatoxin B1, ochratoxin A, immunomodulation on poultry and mammalian; immunotoxins.

Introdução

As micotoxinas são metabólitos secundários de fungos que crescem em alimentos armazenados, rações e subprodutos, representando risco para animais criados em confinamento (Pier et al., 1980), podendo provocar a morte em intoxicações agudas, ou determinar alterações, que afetam diretamente a produção animal, como redução do peso, conversão alimentar, reprodutividade e aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas e parasitárias (Corrier, 1991; Cruz, 1995), causando perdas econômicas consideráveis, especialmente na indústria avícola e suinocultura.

Normalmente os níveis de contaminação natural por micotoxinas não são altos o suficiente para causar micotoxicoses clínicas, porém podem determinar a supressão do sistema imune (Freire et al., 1996). Embora poucos estudos tenham sido realizados com micotoxinas isoladamente, estas ocorrem em associações, entre si e com diferentes substâncias disponíveis no ambiente (Freire, 1995).

O efeito da combinação entre micotoxinas parece ser sinérgico, em alguns casos, e aditivo em outros. A DL 50 de micotoxinas, quando associadas, diminui drasticamente e, dependendo do sistema hospedeiro, pode haver uma ampli-

* Departamento de Microbiologia e Imunologia Veterinária Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465, Km 7, Seropédica, RJ. CEP 23851-970, Caixa Postal 74523, Telefone 55 (21) 682-1082.

Correspondência para ronald@ufrj.br.

ficação entre 50% e 66% da toxicidade causada, o que sugere claramente que estas são mais tóxicas em associações do que isoladamente (Terse et al., 1993).

Deve-se ressaltar que há uma grande carência de dados sobre doses mínimas de micotoxinas, bem como de suas associações possíveis de limitar a resposta imunitária, favorecendo o aparecimento de surtos infecciosos graves e falhas vacinais (Herzog-Soares, 1994). Deste modo, torna-se imprescindível qualificar e quantificar a ação imunomodulatória das micotoxinas e suas associações, além de esclarecer a interferência que os mediadores circulantes exercem sobre a ação destes metabólitos tóxicos, principalmente sobre os animais neonatos, expostos aos diversos contaminantes ambientais.

Material e métodos

Foram utilizados camundongos jovens, da raça Swiss Webster, coelhos adultos New Zealand, aves White Leghorn de um dia de idade e um carneiro adulto, provenientes do biotério do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

A citrulina purificada e cristalizada foi fornecida pelo Centro de Micologia e Micotoxicologia – Convênio Sanidade Animal, UFRRJ/EMBRAPA, com grau de pureza superior a 95%. A aflatoxina B1 e a ocratoxina A foram obtidas comercialmente do distribuidor Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). As micotoxinas foram solubilizadas na proporção de 10mg para cada 1ml de solução 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.

Camundongos suíço-albinos jovens e galinhas de um dia de nascidas, foram estimulados com inoculações intraperitoneais de 0,5 ml, de suspensão de eritrócitos de carneiro (SRBC) a 2,5%. Sete dias depois, os animais foram sacrificados para a retirada do baço. As células esplênicas foram quantificadas em câmara de Neubauer, no retículo próprio para contagem de leucócitos (10^6 , 10^5 e 10^4 células/ml), adicionadas a uma solução contendo RPMI 1640 (DIFCO, USA), antibióticos (penicilina e estreptomycin), Agar Noble (2,1%), eritrócitos de carneiro (2,5%). Os grupos controle foram adicionados de solução salina tamponada, enquanto nos demais grupos, os esplênocitos foram expostos à centésima parte da DL 50% de cada micotoxina e suas associações, utilizando-se: 0,04mg/ml de aflatoxina B1 e ocratoxina A, e 0,01mg/ml de citrulina. A suspensão foi acondicionada em garrafas de cultivo celular, incubada durante quatro horas a 37°C (esplênocitos de camundongos) e 41°C (esplênocitos de galinhas) \pm 1°C, e 5% de CO₂ + 95% de ar atmosférico, em estufa umedecida. Os experimentos foram feitos na presença e na ausência de soro heterólogo (5%), proveniente de animais adultos saudáveis.

A produção de anticorpos *in vitro* foi avaliada pela contagem visual das áreas de hemólise, segundo metodologia descrita por Hudson e Hay (1991).

A viabilidade celular foi avaliada através da técnica de exclusão de Azul de Tripán, onde se retirou 0,1 ml da suspensão de esplênocitos adicionado de 0,8 ml de solução salina e 0,1 ml de Azul de Tripán (diluído na proporção de 1:10). As células viáveis (não coradas) foram quantificadas em câmara de Neubauer, no retículo próprio para contagem de leucócitos.

Resultados

Diferentes efeitos imunomodulatórios foram observados nos esplênocitos de camundongos e aves, mantidos em cultivo artificial e intoxicados com a centésima parte da DL50 da ocratoxina A, aflatoxina B1, citrulina, e suas associações. Células esplênicas de camundongos foram expostas à associação de aflatoxina B1 e citrulina (Figura 1), onde se observou um percentual médio de 63,7% de áreas de hemólise, em comparação com o grupo controle, indicando uma supressão de 36,3% da síntese de anticorpos. Neste mesmo sistema experimental, na presença de soro heterólogo, a ação da associação de aflatoxina B1 e citrulina (Figura 1) levou a um aumento de 27,5% na produção de anticorpos, em relação ao grupo controle.

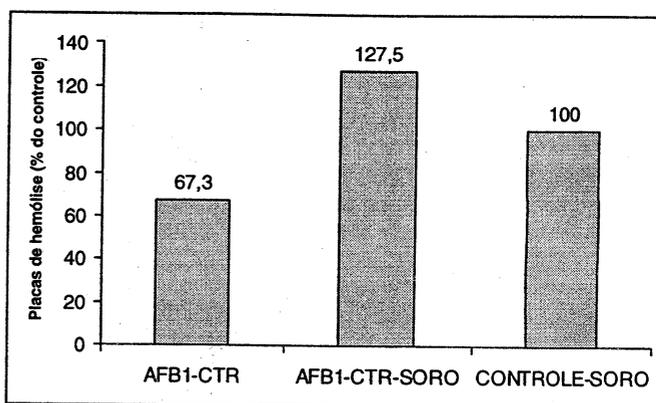


Figura 1: Efeito da associação de citrulina (CTR) e aflatoxina B1 (AFB1) sobre a secreção de anticorpos antieritrócitos de carneiro por esplênocitos de camundongos albinos na presença e na ausência de soro heterólogo (soro de coelho sadio). Concentração relativa de anticorpos estimada de acordo com o número de placas de hemólise. Resultado médio de 10 observações por esquema experimental ($p < 0,01$).

Nos experimentos desenvolvidos, utilizando a associação de aflatoxina B1, citrulina e ocratoxina A (Figura 2), constatou-se uma significativa imunossupressão de 93% em relação ao grupo controle, indicando a potencialização da atividade supressora destas micotoxinas quando associadas. Experimentos posteriores foram realizados na presença de soro

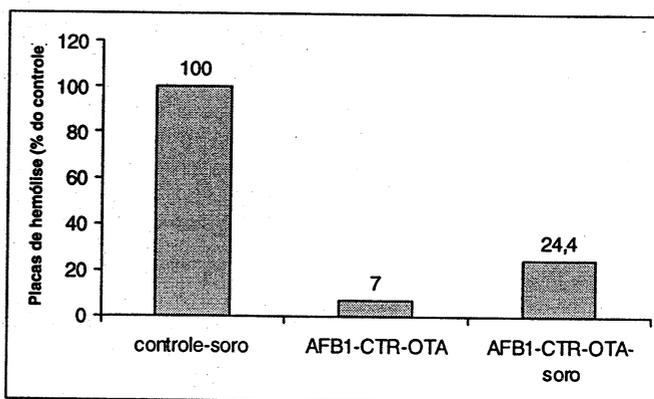


Figura 2: Efeito da associação de aflatoxina B1 (AFB1), citrulina (CTR) e ocratoxina-A (OTA) sobre a secreção de anticorpos antieritrócitos de carneiro por esplênocitos de camundongos albinos na presença e na ausência de soro heterólogo (soro de coelho sadio). Concentração relativa de anticorpos estimada de acordo com o número de placas de hemólise. Resultado médio de 10 observações por esquema experimental ($p < 0,01$).

heterólogo (Figura 2), utilizando-se essa mesma associação de micotoxinas, onde a imunossupressão foi de apenas 75,9%, comparado ao grupo controle.

Ensaio foram realizados com intoxicação dos esplenócitos apenas com citrinina (Figura 3), onde se observou um percentual médio de 112,3% de áreas de hemólise, levando a crer que a toxina isolada induz a uma imunestimulação. A citrinina foi também testada na presença de soro heterólogo (Figura 3), elevando a produção de anticorpos em 106,7%, em comparação ao grupo controle. A ocratoxina A foi testada no sistema celular de camundongos (Figura 3), causando uma supressão imunológica de 49,5% em relação ao grupo controle, na ausência de soro heterólogo. O mesmo experimento foi realizado com a aflatoxina B1 (Figura 3), observando-se 91,4% de supressão da resposta imune.

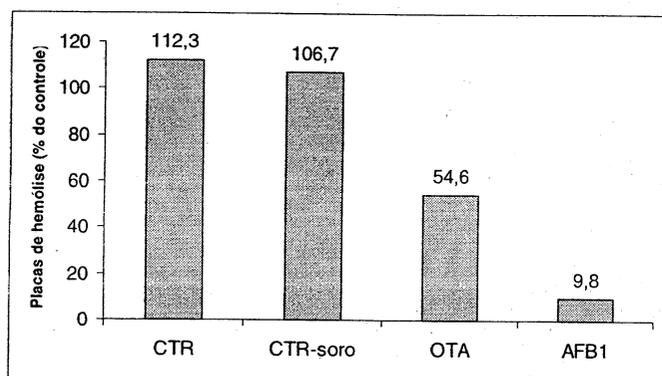


Figura 3: Efeito da aflatoxina B1 (AFB1), citrinina (CTR) e ocratoxina A (OTA) sobre a secreção de anticorpos antieritrócitos de carneiro por esplenócitos de camundongos albinos na ausência de soro heterólogo (soro de coelho sadio). O efeito de CTR foi também avaliada na presença de soro heterólogo. Concentração relativa de anticorpos estimada de acordo com o número de placas de hemólise. Resultado médio de 10 observações por esquema experimental ($p < 0,01$).

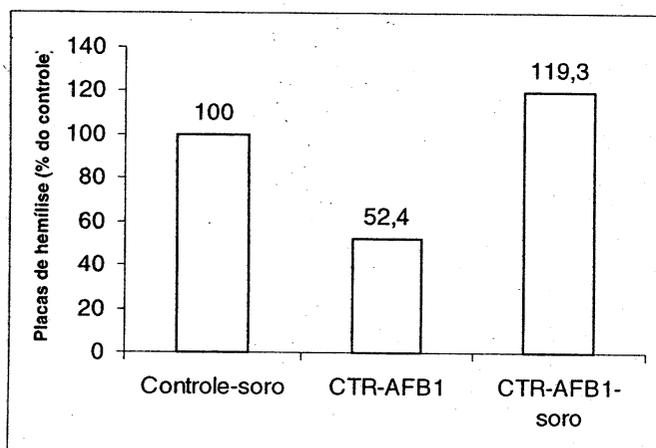


Figura 4: Efeito da associação de citrinina (CTR) e aflatoxina B1 (AFB1) sobre a secreção de anticorpos antieritrócitos de carneiro por esplenócitos de aves, na presença e na ausência de soro heterólogo (soro de coelho sadio). Concentração relativa de anticorpos estimada de acordo com o número de placas de hemólise. Resultado médio de 10 observações por esquema experimental ($p < 0,01$).

Seguindo a mesma metodologia, foram desenvolvidos experimentos utilizando-se células esplênicas de galinhas White

Leghorn. No grupo tratado com a associação de citrinina e aflatoxina B1 (Figura 4), observou-se uma imunossupressão de 47,6% em relação ao grupo controle. Quando da adição de soro (Figura 4), observou-se uma estimulação de 19,3%, em relação ao grupo controle.

Discussão

Existem vários trabalhos reportando a atividade de micotoxinas diversas (aflatoxina, fumonisina, toxina T2, roridina A, entre outras) sobre as células T (Reddy et al., 1989; Corrier, 1991; Cruz et al., 1995; Freire, 1995; Cruz et al., 1996; Herzog-Soares, 1997). Várias outras micotoxinas podem determinar a morte prematura de células imunocompetentes, podendo provocar alterações celulares compatíveis com a apoptose (Cruz et al., 1996). Estes fatos reforçam a idéia de que os fagócitos circulantes são as primeiras células a serem afetadas por pequenas doses da mistura citrinina-aflatoxina-ocratoxina. Reddy e colaboradores, em 1989, reportaram experimentos com camundongos, onde a citrinina seria um indutor, e não supressor da produção de anticorpos, em elevadas doses.

Corrier (1991) reportou experimentos nos quais esta micotoxina não parecia promover alterações imunitárias em aves. Apesar disso, até o presente, a associação de citrinina, aflatoxina B1 e ocratoxina A não apareceu na literatura. Uma vez que todas são freqüentemente detectadas em rações para consumo animal em nosso país, o presente ensaio procura contemplar esta lacuna científica.

Curiosamente, os esplenócitos expostos à citrinina, em baixas concentrações, sofreram significativo aumento percentual na produção de anticorpos (12,3%), oriundos de animais previamente imunizados contra antígeno particulado inerte. As diferenças observadas entre os presentes resultados e os de Reddy et al. (1989) podem ser decorrentes da via de administração, da dose, assim como a assimilação da micotoxina. Segundo Terse et al. (1993), a via de administração e o estado do animal irão interferir diretamente na DL50 de diferentes micotoxinas. Especificamente para a citrinina, os ensaios *in vitro* correspondem à assimilação *in vivo*, para animais neonatos expostos tanto oralmente quanto peritonealmente (Herzog-Soares, 1997).

A associação de citrinina com aflatoxina B1 levou a resultados mais expressivos de supressão na secreção de anticorpos em camundongos. Neste caso, os resultados mostraram haver efeito aditivo quando as micotoxinas foram associadas. Tanto a associação de citrinina-aflatoxina B1, ocratoxina A e aflatoxina B1 isoladas, quanto a associação destas três micotoxinas causaram uma supressão da produção de anticorpos em esplenócitos de camundongos.

Para aves, os resultados foram similares, sugerindo que os efeitos não são restritos aos mamíferos, como sugerido por Corrier (1991).

É digno de nota o fato de que a adição de soro heterólogo proveniente de animal adulto, não intoxicado, diminuiu consideravelmente os efeitos imunossupressivos induzidos pelas micotoxinas, tanto em camundongos quanto em galinhas. A ação dos mediadores presentes no soro de animais adultos, sobre a ação imunossupressiva das micotoxinas e suas associações, sugerem uma possível imunoterapia preventiva para animais de criação naturalmente expostos às micotoxinas ambientais assim como suas associações, diminuindo as consideráveis perdas econômicas.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Referências bibliográficas

- CORRIER, D.E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 30, p. 73-87, 1991.
- CRUZ, L.C.H. Características gerais das micotoxinas e micotoxicoses: Reflexos na indústria avícola. *Anais do I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves – FACTA* p. 1-13, 1995.
- CRUZ, L.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, 1996.
- CRUZ, L.C.H., MARTORELLI, R.A., FREIRE, R.B. In vitro antibodies production impairment by the association of aflatoxin B1-citrin. *IX Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. PM 105*, p. 240, 1996.
- FREIRE, R.B. Micotoxinas e imunossupressão em aves. *Anais do I Simpósio Internacional sobre Micotoxinas e Micotoxicoses em Aves*, p. 115-125, 1995.
- FREIRE, R.B., SOUZA, C.C., CRUZ, L.C.H. Humoral immunoresponse discontinuance caused by citrinin. *IX Internacional IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins. PM 106*, p. 241, 1996.
- HERZOG-SOARES, J.D.A. *Efeito in vitro da citrinina sobre macrófagos Peritoniais de galinhas doadoras da raça Leghorn*. 1994. 43 f. Tese (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- 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)*. 1997. 88 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Parasitologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- HUDSON, L. & HAY, F. (Ed.) *Practical Immunology*. 3. ed. N.Y.: Blackwell Scientific Publications. 1991, 507 p.
- PIER, A.C., RICHARD, J.L., CYZEWSKI, S.J. Implication of mycotoxins in animal disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 176, p. 719-724, 1980.
- REDDY, R.V, TAYLOR, M.J., SHARMA, R.P. Effects of aflatoxin B1 on murine lymphocytic functions. *Toxicology*, v. 54, p. 31-44, 1989.
- TERSE, P.S., MADRYASTRA, MS., ZUROVAC, O., STRINGFELLOW, D., MARQUADT, R.R., KEMPPAINEN, B.W. Comparison of in vitro and in vivo biological activity of mycotoxins. *Toxicon*, v. 31, p. 913-919, 1993.