

Supressão da resposta imunitária humoral causada pela citrinina

[*Humoral immunosuppression caused by citrinin*]

C.A. Carvalho, B.C.T.M. Fernandes, R.B. Freire*

Instituto de Biologia – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
BR 465 km 7
23890-000 - Seropédica, RJ

RESUMO

Avaliou-se o efeito imunotóxico causado por exposição a baixas doses de citrinina ($2,5\text{mg kg}^{-1}$) em camundongos albinos expostos à micotoxina antes ($n=15$), durante ($n=15$) e após ($n=15$) a imunização com antígeno inerte, representado por eritrócitos de carneiro – *sheep red blood cells* (SRBC). Quinze camundongos foram usados como controle (não intoxicados). Sete dias após o tratamento, os animais foram sangrados e os títulos de anticorpos anti-SRBC e de complemento foram determinados. A citrinina diminuiu os títulos de anticorpos primários em todos os grupos intoxicados. A intoxicação antes e após a imunização provocou diminuição em 87,5% nos títulos médios de anticorpos específicos. A exposição simultânea à imunização gerou diminuição de 75%. Houve acentuada redução nos níveis de complemento circulante, detectada nos animais previamente intoxicados (93,8%), ou intoxicados juntamente com a imunização (87,5%).

Palavras-chave: citrinina, micotoxinas, imunossupressão, cumarinas

ABSTRACT

The immunotoxic effect caused by citrinin was evaluated in albino mice exposed to a single dose of 2.5mg.kg^{-1} before ($n=15$), concomitantly ($n=15$) and after ($n=15$) immunization with an inert antigen represented by sheep red blood cells (SRBC). The animals were bleed seven days following the mycotoxin exposure for antibodies anti-SRBC and complement titration and compared to results obtained from non-exposed controls ($n=15$). It was detected a decreasing antibodies titration in all the intoxicated animals. Those animals that received citrinin before and after SRBC sensitization equally presented a lowering of 87.5% on the primary antibodies level. The exposure to the mycotoxin simultaneously to the SRBC sensitization caused a decrease equivalent to 75%. A remarkable effect was also demonstrated for the circulating complement in both groups of animals, with a decrease of 87.5% on those intoxicated before and of 93.8% on those treated concomitantly to the SRBC sensitization.

Keywords: citrinin, mycotoxins, immunosuppression, coumarins

INTRODUÇÃO

A citrinina é um subproduto metabólico de origem cumarínica, oriundo do crescimento de várias espécies de fungos dos gêneros

Penicillium e *Aspergillus*. Ela e outras micotoxinas são produzidas durante o desenvolvimento fúngico em grãos, alimentos processados e produtos alimentícios, oriundos ou não do processamento e da manipulação em

Recebido para publicação em 15 de outubro de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 1 de abril de 2004

*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: rbfreire@ufrj.br

citricultura. O consumo de baixa concentração, por animais sensíveis às micotoxinas, pode conduzir à morte dentro de poucas horas. O mais comum é a ocorrência de intoxicações que variam de agudas a crônicas, afetando, principalmente os animais criados sob regime de confinamento, tais como aves e suínos.

Em geral, a saúde e a produtividade de animais alimentados com produtos contaminados com concentrações subletais de citrinina são seriamente prejudicados. A micotoxina modula a resposta inflamatória em aves e mamíferos, interferindo em processos de digestão e secreção de mediadores a partir de células imunocompetentes (Herzog-Soares, 1994; Souza et al., 1997). Uma vez que os componentes do sistema complemento são secretados por fagócitos durante os processos inflamatórios, os efeitos comumente atribuídos às diversas micotoxinas sobre a síntese protéica podem acarretar deficiências na sua produção, permitindo, assim, a permanência de agentes infecciosos e a ocorrência de infecções oportunistas (Corrier, 1991; Freire et al., 1996).

Acredita-se que a ação supressiva de micotoxinas sobre a resposta inflamatória tenha efeito bastante significativo sobre a resposta adaptativa humoral em mamíferos diversos (Freire et al., 1996). A citrinina foi caracterizada por não afetar a produção de anticorpos (Reddy et al., 1988; Corrier, 1991), a despeito de causar modificações drásticas nos níveis de leucócitos circulantes, com conseqüente leucopenia (Reddy et al., 1988; Herzog-Soares, 1997). Recentemente, verificou-se que a citrinina também pode estar associada à indução de blastogênese linfocitária (Souza et al., 1999). O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito da intoxicação sub-clínica por citrinina sobre a atividade do sistema complemento e sobre a resposta imune humoral para antígenos inertes, durante diferentes fases de imunização, utilizando-se camundongos albinos (Swiss Webstern) como modelo experimental.

MATERIAL E MÉTODOS

Usou-se citrinina purificada em estado cristalino, fornecida pelo Centro de Micologia e Micotoxicologia (CMM)–Convênio Sanidade Animal UFRRJ/EMBRAPA. A micotoxina foi

solubilizada em tampão carbonato-bicarbonato (26 partes de uma solução contendo 21,2g de Na_2CO_3 em 1000ml adicionados a 74 partes de uma solução contendo 16,8g de NaHCO_3 para 1000ml, pH 9,5) e, posteriormente, diluída em 0,1M de salina tamponada com fosfatos (PBS 0,1M – 8,0g de NaCl; 0,2g de KCl; 1,2g de Na_2HPO_4 ; 0,2g de KH_2PO_4 ; H_2O qsp 1000ml, pH 7,2).

Trinta camundongos suíços albinos, machos, com duas semanas de vida, com peso médio de 25 gramas, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal Fluminense, foram mantidos em caixas apropriadas e alimentados com ração comercial livre de micotoxinas e água potável *ad libitum*. Os animais foram imunizados de acordo com metodologia clássica, mediante inoculação intraperitoneal de 1ml de uma suspensão de eritrócitos de carneiro (*sheep red blood cells* – SRBC) a 2,5% em PBS a 0,1M, pH 7,2. Grupos de cinco animais foram sensibilizados antes, durante e após o tratamento com citrinina, e estudados comparativamente a três grupos de cinco animais-controle não tratados com micotoxinas. Todos os experimentos foram realizados com três repetições. Após intervalo de sete dias, obtiveram-se amostras de soro dos animais a partir da sangria na veia mamária esquerda, tal como descrito por Hudson e Hay (1989). Os soros foram agrupados de acordo com a sensibilização por SRBC e com o tratamento com citrinina, e divididos em dois lotes, o primeiro relativo às amostras de soro inativadas pela incubação a $56\pm 1^\circ\text{C}$, durante 30 minutos, e o segundo lote constituído pelas amostras não inativadas (soro fresco). Os diferentes agrupamentos e seus respectivos lotes foram acondicionados em frascos apropriados, adicionados de 0,01% de timerosal e mantidos a $-20\pm 1^\circ\text{C}$, até o momento de uso. Os camundongos foram experimentalmente tratados com uma dose equivalente a 2,8% da DL_{50} de 89mg/kg, anteriormente estabelecida para essa espécie animal (Terse et al., 1993). A micotoxina foi administrada intraperitonealmente, na proporção de 2,5mg/kg, a grupos de cinco animais, excetuando-se os grupos-controle, que receberam somente o veículo (PBS, 0,1M, pH 7,2).

Os níveis séricos de complemento foram avaliados utilizando-se o soro fresco, não inativado, recém obtido pela exsanguinação dos animais (Hudson e Hay, 1989). As diferentes amostras de soro de cada agrupamento experimental foram diluídas serialmente, de 1:2 até 1:4096, em microplacas de sorologia. Sobre as amostras de soro diluídas, foram adicionadas 25µl de SRBC a 2,5% e 25µl de duas unidades líticas de hemolisina de camundongos SW, anti-SRBC, preparadas no setor de imunologia do laboratório de toxicologia ambiental (Departamento de Biologia Animal – DBA/Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro). Foram feitos controles da hemolisina, dos SRBC e dos soros dos camundongos testados, para garantir que não ocorreriam hemólises por motivos distintos à fixação do complemento pelo sistema hemolítico (SRBC - hemolisina). As microplacas foram incubadas a 37±1°C, durante 40 minutos, e analisadas quanto ao título médio de complemento existente em cada agrupamento de soros. Considerou-se como título a maior diluição do soro-teste capaz de causar hemólise frente ao sistema hemolítico.

A titulação dos anticorpos anti-SRBC, produzidos pelo primocontato dos diferentes agrupamentos uma semana antes, foi realizada por meio do método clássico de fixação do complemento (Hudson e Hay, 1989), visto que eles seriam, em sua maioria, pertencentes à classe IgM. Para tanto, procedeu-se ao ensaio utilizando-se como fonte de hemolisina os soros inativados obtidos de cada grupo. Uma vez que o tratamento a 56±1°C elimina a atividade complementar do soro, acrescentou-se a cada diluição dos diferentes agrupamentos, 25µl de SRBC a 2,5% e 25µl de uma solução com duas unidades de complemento de soro fresco de coelho, preparadas no laboratório de imunotoxicologia do DBA da UFRRJ. Foram feitos controles do complemento dos eritrócitos de carneiro e dos soros dos camundongos a serem testados, para garantir que não ocorreriam hemólises por motivos distintos à fixação do complemento, pela existência de anticorpos fixadores do complemento nos soros dos animais. As microplacas foram incubadas a 37±1°C, durante 40 minutos, e analisadas quanto ao título médio de anticorpos existentes em cada agrupamento de soros. Considerou-se como

título a maior diluição do soro-teste capaz de causar hemólise frente ao complemento.

Usou-se o teste de Tuckey para a comparação de médias, conforme Souza et al. (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A freqüente ocorrência de intoxicações naturais causadas por micotoxinas cumarínicas, tais como a citrinina e a ocratoxina, suscita discussão a respeito da intoxicação subclínica ocasionada por essas micotoxinas. Na realidade, pouco se conhece sobre a atividade imunomodulatória desses compostos. Reddy et al. (1988) foram os primeiros investigadores a detectar alterações imunitárias em animais expostos à citrinina, identificando uma linfopenia induzida por exposições à citrinina, e sugeriram que ela atuaria também como uma toxina imunoestimuladora. Embora tenha sido capaz de induzir nefropatias em concentrações elevadas, em dosagens menores seria um imunoestimulador, a despeito de reduzir a quantidade de linfócitos circulantes. Segundo Corrier (1991), a citrinina não causaria efeitos imunológicos importantes em aves ou mamíferos. No presente trabalho, procurou-se identificar a ação imunomodulatória decorrente da exposição de camundongos albinos à baixas doses de citrinina, uma vez que, em experimentos anteriores, foram observados efeitos antiinflamatórios marcantes, causados por pequenas concentrações dessa micotoxina (Herzog-Soares, 1994; Souza et al., 1999).

Os títulos médios de anticorpos específicos caíram 87,5% nos animais expostos à citrinina antes ou depois da imunização com antígeno inerte. A exposição simultânea à imunização gerou diminuição de 75%. Houve, também, acentuada redução nos níveis de complemento circulante, detectada nos animais previamente intoxicados (93,8%), ou intoxicados juntamente com a imunização (87,5%). O título médio de anticorpos circulantes anti-eritrócitos de carneiro foi de 1:64 nos indivíduos expostos à citrinina antes ou após a imunização, 1:128 para aqueles que receberam o antígeno inerte concomitantemente à exposição a micotoxina e 1:512 para os animais pertencentes ao grupo-controle (não intoxicado) (Fig. 1). O título médio

de complemento detectado foi de 1:256 nos animais previamente expostos, 1:512 nos intoxicados ao mesmo tempo em que se administrou o antígeno e 1:4096 nos intoxicados após imunização, e nos do grupo-controle (Fig. 2). A não interferência sobre a resposta

adaptativa, quando a micotoxina foi administrada juntamente com o antígeno inerte, sugere a formação de complexos capazes de inibir a ação dessa micromolécula tóxica, conforme sugerido por Freire (1996) e Souza et al. (1999).

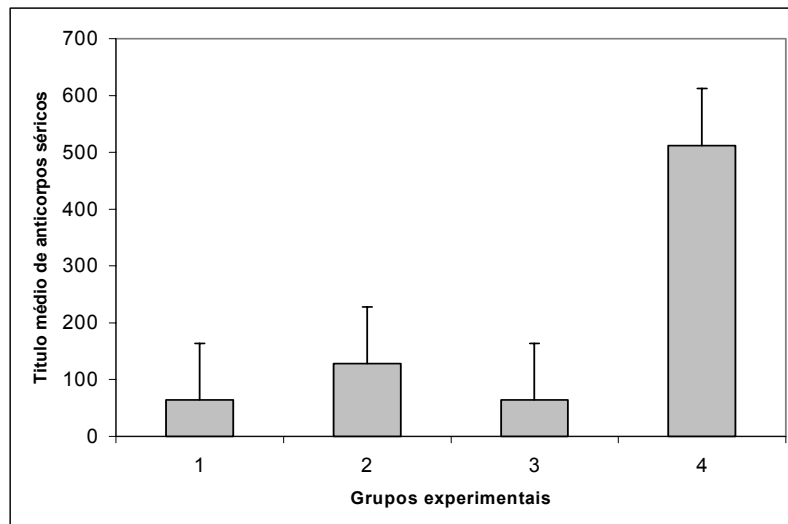


Figura 1. Título médio de anticorpos antieritrócitos de carneiro (SRBC) detectados em grupos de camundongos suíço-álbinos (SW) tratados com $2,5\text{mg.kg}^{-1}$ de citrinina antes (1); concomitantemente (2) e após sensibilização (3) com SRBC a 2,5%, em relação a um grupo controle não intoxicado (4). Os resultados são oriundos de três repetições para cada grupo de cinco animais e representam a média \pm EPM, com $P < 0,01$.

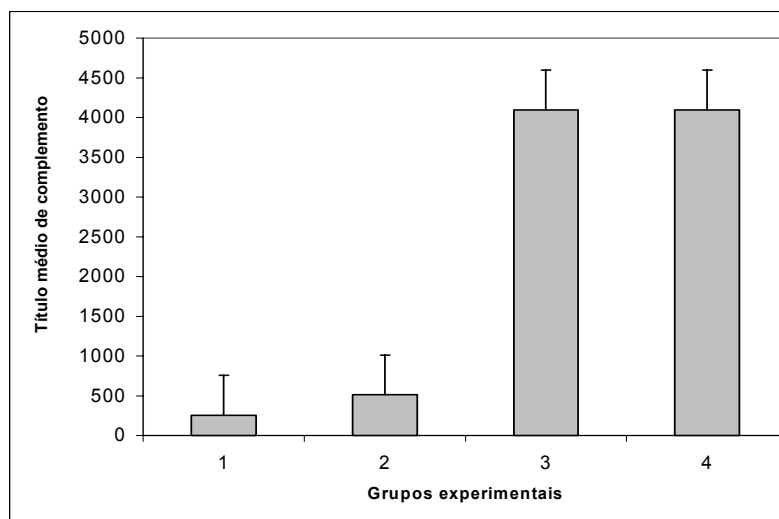


Figura 2. Título médio de complemento detectado em grupos de camundongos suíço-álbinos (SW) tratados com $2,5\text{mg.kg}^{-1}$ de citrinina antes (1); concomitantemente (2) e após sensibilização (3) com SRBC a 2,5%, em relação a um grupo controle não intoxicado (4). Os resultados são oriundos de três repetições para cada grupo de cinco animais e representam a média \pm EPM, com $P < 0,01$.

Os efeitos contundentes sobre o funcionamento do sistema complemento foram semelhantes aos observados em trabalhos anteriores, nos quais se detectou uma potente inibição na produção de citocinas e interferon para determinados grupos de micotoxinas, tais como fumonisinas e tricotecenos (Gerberick e Sorenson, 1983; Hughes et al., 1989; Qureshi e Hagler, 1992). Souza et al. (1997) observaram que a supressão total da fagocitose, induzida por citrinina, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, seria o resultado de um processo de esgotamento metabólico induzido por exposição a baixas doses de micotoxina. Ensaio realizado com a toxina T2 relatam a inibição na biossíntese de fibronectina como sendo a principal causa de efeitos inibitórios na fagocitose, porque afetaria, de modo direto, a ingestão de partículas e a formação de fagossomas (Gerberick e Sorenson, 1983). Assim, a interferência na resposta adaptativa estaria diretamente relacionada à incapacidade de processamento e apresentação dos antígenos disponibilizados para o sistema imunitário dos camundongos expostos a citrinina (Freire, 1996; Freire et al., 1996). Os níveis séricos mais baixos de complemento, observados nos animais sensibilizados após exposição à citrinina, indicam que esta tende a mostrar-se mais imunotóxica para animais neonatos que ainda não foram sensibilizados pelos diferentes patógenos do ambiente. O fato de ter havido significativa diminuição dos níveis de anticorpos dos animais intoxicados após a imunização sem, contudo, ocorrer diminuição significativa nos níveis de complemento, sugere mecanismos diferenciados, relacionados à síntese de anticorpos. A inibição da síntese macromolecular induzida por essa micotoxina foi observada *in vitro* por Braunberg et al. (1992), que demonstraram que as micotoxinas citrinina e ocratoxina podem induzir pronunciada inibição dessa atividade, dependendo do tipo celular envolvido, das concentrações de micotoxinas e da espécie animal estudada. Nesse experimento, no entanto, os autores concluíram que a citrinina, em concentrações acima de $0,25\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot 10^{-6}$ células, seria capaz de produzir inibição completa da síntese de proteínas prejudicando, dentre outras funções fisiológicas importantes, a resposta imune.

A queda no título de anticorpos anti-eritrócitos de carneiro (anti SRBC) detectada nos animais

expostos à citrinina assemelhou-se àquela observada por Hughes et al. (1989) em camundongos expostos aos diversos compostos macrocíclicos do grupo dos tricotecenos, atingindo até 73% de redução na produção primária (IgM), e de 10% na produção secundária (IgG). Reddy et al. (1988) demonstraram que a produção primária de anticorpos foi deprimida nos animais expostos a baixas doses de citrinina, aumentando, porém, quando os animais foram intoxicados com doses mais elevadas. Nesse ensaio, os animais foram sensibilizados após duas semanas de exposição crônica e contínua à citrinina, em doses que variaram de 0,12 a $3,0\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. A dose de $2,5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ utilizada no presente trabalho originou resultados semelhantes aos relacionados às menores dosagens de citrinina empregadas por Reddy et al. (1988). A semelhança observada sugere que, uma vez que no presente trabalho utilizou-se uma dose que se aproxima da maior dose utilizada por esses autores, ocorreu detoxicação da citrinina inoculada, que tornou os níveis de micotoxina baixos o suficiente para produzirem diminuição da produção de anticorpos, tal como ocorre em intoxicações crônicas induzidas por pequenas doses de citrinina. Experimentos anteriores assinalam a ocorrência de apoptose induzida por doses mais elevadas de citrinina, além de estimulação, caracterizada por proliferação inespecífica de linfócitos, porém mais relacionada a linfócitos T (Hughes et al., 1989; Freire et al., 1996; Carvalho et al., 1997; Souza et al., 1999). O efeito imunoestimulante provocado por doses mais elevadas de citrinina, embora aparentemente controverso, reforça a idéia de que essa micotoxina apresente diferentes mecanismos de atuação, relacionados à biodisponibilidade e à capacidade de detoxicação (maturidade) do organismo animal exposto.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a citrinina é imunotóxica para animais jovens, comprometendo tanto a resposta humoral adaptativa como a resposta natural, quando assimilada em baixas concentrações, mesmo após uma única exposição. Assim, os animais em idade de vacinação representam um grupo de risco para o qual deve-se dar mais atenção, especialmente porque essa micotoxina

pode comprometer sua capacidade de resposta às diferentes vacinas, sem sintomas clínicos indicativos de imunossupressão ou intoxicação.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado sob orientação do Professor Ronald B. Freire, com apoio do CNPq - Projeto nº 305370088-0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAUNBERG, R.C.; GANTT, O.; BARTON, C. et al. In vitro effects of the nephrotoxins Ochratoxin A and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, v.22, p.464-470, 1992.
- CARVALHO, C.A.; RIBEIRO, C.S.; PEREIRA, A.A. et al. Citrinin: modulation chicken's lymphocyte blastogenesis. In: LATINOAMERICAN MYCOTOXICOLOGY CONGRESS, 2., 1997, Maracay. *Proceedings...* Maracay, 1997. Resumo.
- CORRIER, D.E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.30, p.73-87, 1991.
- FREIRE, R.B. Micotoxinas e resposta imune. In: CRUZ, L.C.H. (Ed.) *Micotoxinas: perspectiva latinoamericana*. Rio de Janeiro: Seropédica, 1996. p.141-148.
- FREIRE, R.B.; SOUZA, C.C.; CRUZ, L.C.H. Humoral immunoresponse discontinuance caused by citrinin. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 1996, Havana. *Anais...*Havana, 1996. Resumo.
- GERBERICK, G.F.; SORENSON, W.G. Toxicity of t2 toxin a Fusarium mycotoxin to alveolar macrophages *in vitro*. *Environm. Rev.*, v.32, p.269-285, 1983.
- HERZOG-SOARES, J.D.A. *Efeito regulador da citrinina sobre macrófagos de galinhas da raça Leghorn*. 1994. 87f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- HERZOG-SOARES, J.D.A. *Relação parasito-hospedeiro: ação de subdoses de micotoxinas sobre a resposta imunitária em aves e mamíferos para coccídeos*. 1997. 145f. Tese (Doutorado em Microbiologia Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- HUDSON, L.; HAY, F. *Complement in practical immunology*. 3.ed. Blackwell, 1989. p.264-280.
- HUGHES, B.J.; HIESH, G.C.; JARVIS, B.B. et al. Effects of macrocyclic thricothecene mycotoxins on the immune system. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, v.18, p.388-395, 1989.
- QURESHI, M.A.; HAGLER Jr., W.M. Effect of Fumonisin B1 exposure on chicken macrophage functions *in vitro*. *Poult. Sci.*, v.71, p.104-112, 1992.
- REDDY, R.V.; TAYLOR, M.J.; SHARMA, R.P. Evaluation of citrinin toxicity on the immune functions of mice. *J. Food Protec.*, v.51, p.32-36, 1988.
- SOUZA, M.M.S.; FREIRE, R.B.; CARVALHO, C.A. Avaliação da ação imunomodulatória da citrinina através da estimulação da blastogênese linfocitária. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.21, p.69-71, 1999.
- SOUZA, M.M.S.; FREIRE, R.B.; SOUZA, C.C. et al. Supressão da resposta inflamatória por exposição a citrinina: proposta de mecanismo de ação. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.19, p.28-30, 1997.
- TERSE, P.S.; MADHYASTHA, M.S.; ZUROVAC, O. et al. Comparison of *in vitro* and *in vivo* biological activity of mycotoxins. *Toxicon*, v.31, p.913-919, 1993.