

Estudos da toxicidade de misturas de aflatoxina M₁ e ocratoxina A numa linha celular humana

Ana Maria Tavares^{1,2}, Paula Alvito^{2,3}, Susana Loureiro⁴,
Henriqueta Louro¹, Maria João Silva¹
m.joao.silva@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(3) Centro de Estudos Ambientais e Marinhos (CESAM), Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

(4) Departamento de Biologia (DB), CESAM, Universidade de Aveiro.

Introdução

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos, abrangendo mais de 500 compostos diferentes, de entre os quais se salientam as aflatoxinas (AF), a ocratoxina A (OTA), os tricotecenos, a zearalenona, as fumonisinas e a patulina⁽¹⁾. De entre as AF, a aflatoxina B₁ (AFB₁) é a mais abundante em alimentos à base de cereais e também a mais tóxica, sendo cancerígena para o homem^(2,3); o seu metabolito hidroxilado, a AFM₁, tem sido detetado em leites e derivados e a sua toxicidade e mecanismo de ação estão ainda pouco estudados^(4,5,6). A OTA contamina principalmente cereais e derivados, possuindo propriedades nefrotóxicas, hepatotóxicas, imunotóxicas, genotóxicas e possivelmente carcinogénicas para o homem^(7,8). A exposição humana a micotoxinas ocorre, principalmente, através da ingestão de alimentos contaminados e pode dar origem a patologias graves⁽⁸⁾. Em particular, a contaminação de alimentos para crianças com micotoxinas, tais como AF e OTA, tem sido motivo de grande preocupação para a saúde pública⁽⁹⁾, especialmente considerando o seu potencial para induzir efeitos genotóxicos e potencialmente

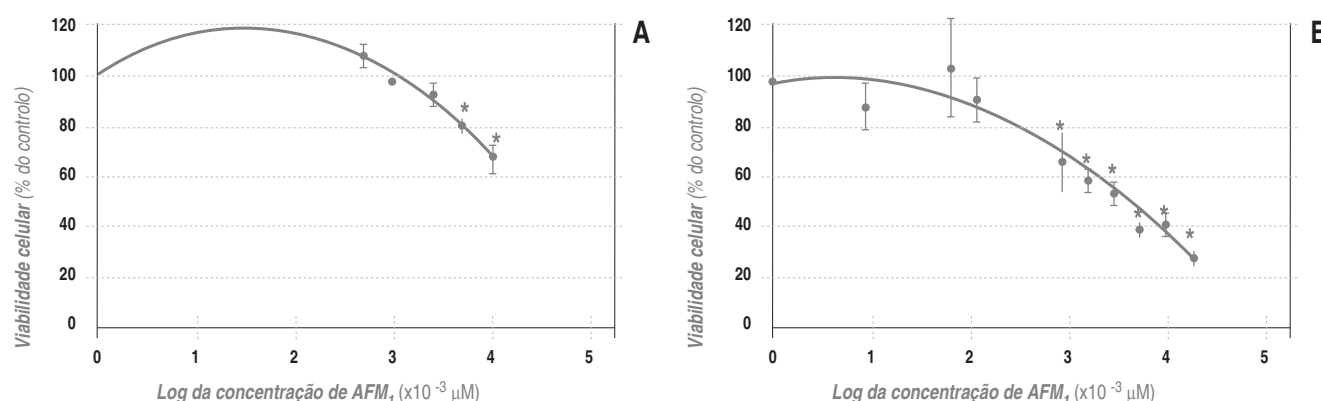
carcinogénicos. Estudos recentes têm demonstrado a possibilidade de co-ocorrência de baixas concentrações de AF e OTA em alimentos para crianças^(10,11), um grupo especialmente vulnerável, pelo que urge avaliar o efeito tóxico combinado de misturas destas toxinas e o seu potencial impacto na saúde. No entanto, são ainda escassos os estudos que abordam os efeitos de misturas e os resultados têm sido discrepantes^(12,13,14). O presente estudo teve como objetivo caracterizar os efeitos citotóxicos de misturas de AFM₁ e OTA, comparativamente aos seus efeitos individuais, utilizando como modelo experimental uma linha celular (Caco-2) derivada do epitélio intestinal humano que representa o primeiro local de contacto de ambas as toxinas no organismo, após a sua absorção por via oral.

Resultados e Discussão

A exposição de culturas de células Caco-2 a várias concentrações de AFM₁ e de OTA causou um decréscimo da viabilidade celular dependente da dose (ensaio de incorporação do vermelho neutro⁽¹²⁾, sendo que os valores das concentrações de AFM₁ e OTA necessários para causar a morte de 50% das células (IC₅₀), foram de, respetivamente, 25,7 µM e 16,98 µM (Gráfico 1).

No Gráfico 2 apresentam-se dois exemplos da citotoxicidade combinada das duas micotoxinas, relativamente ao seu efeito individual. Comparou-se o efeito observado para cada mistura com o efeito esperado, calculado a partir da toxicidade de cada micotoxina, por forma a investigar a existência de eventuais interações entre ambas, nomeadamente sinergismo, antagonismo, ou efeitos dependentes da dose. Assim, os dados experimentais foram modelados recorrendo-se a dois modelos de referência, o da Adição da Concentração (AC) e o da Ação Independente (AI). O primeiro assume que a ação combinada dos compostos com modo de ação (MoA) idêntica é a soma das suas toxicidades individuais⁽¹⁶⁾. Sabendo-se que a toxicidade da OTA pode ser mediada por uma ação lesiva direta ao nível da molécula de DNA

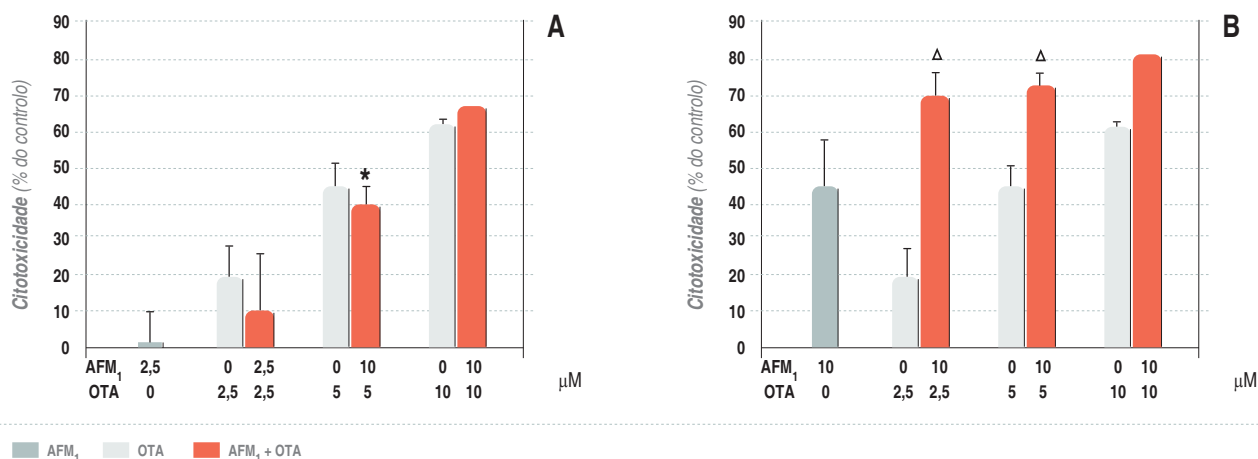
Gráfico 1: Viabilidade das células Caco-2 após exposição a (A) AFM₁ e (B) OTA durante 48h.



Cada ponto representa a média (±DP) de 3 experiências.

artigos breves_ n. 8

Gráfico 2: Efeito citotóxico combinado de diferentes doses de AFM₁ e OTA, comparativamente ao seu efeito individual em células Caco-2.



(*) citotoxicidade da mistura significativamente diferente do efeito da AFM₁; (Δ) citotoxicidade da mistura significativamente diferente do efeito da OTA.

e por uma ação indireta, através de uma interferência com o sistema redox da célula (14) e inferindo-se que a AFM₁ poderá induzir stress oxidativo na célula (5), poderia preconizar-se alguma sobreposição nos seus MoA. Contudo, considerando as incertezas ainda existentes neste domínio, assumiu-se a possibilidade de qualquer um dos dois modelos poder explicar o seu efeito tóxico combinado. Considerando o modelo mais conservador, o da AC, os resultados sugeriram que a AFM₁ e OTA, quando em mistura, produzem um efeito tóxico antagonístico. O modelo da AI - baseado na hipótese de um MoA diferente em que a probabilidade de toxicidade associada a um dado composto é independente da do outro composto - indicou um efeito dependente da dose, sugerindo que as micotoxinas em doses mais baixas são antagonistas enquanto em doses mais elevadas se poderão tornar sinérgicas. Dado que num cenário de contaminação por via alimentar o homem estará exposto a doses baixas de cada micotoxina, o efeito antagonístico será, possivelmente, o mais realista.

Conclusão

Em conclusão, o presente estudo evidenciou a existência de efeitos interativos entre as micotoxinas AFM₁ e OTA em células do epitélio intestinal humano, revelando a predominância de um padrão de antagonismo. Assim, não se espera que a mistura destas micotoxinas possa constituir um perigo para a saúde, superior ao exercido individualmente. Os estudos prosseguirão no sentido de compreender o modo de ação dessas micotoxinas quando em mistura, com vista a explicar o efeito observado. Será também relevante, em termos de saúde humana, abordar os efeitos genotóxicos combinados destas e de outras micotoxinas que podem co-ocorrer num mesmo alimento.

Agradecimentos

Este estudo foi parcialmente financiado pela FCT, através do financiamento plurianual PEST-OE/SAU/UI0009/2011 e do projeto PTDC/DTP-FTO/0417/2012.

Artigo baseado em: Tavares AM, Alvito P, Loureiro S, et al. Multi-mycotoxin determination and in vitro combined cytotoxic effects of aflatoxin M1 and ochratoxin. World Mycotoxin Journal. 2013;6(4): 375-388. doi: 10.3920/WMJ2013.1554

Referências bibliográficas:

- Koppen R, Koch M, Siegel D, et al. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;86:1595-1612.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. Lyon: WHO/IARC, 2002:171-248. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; 82)
- Caloni F, Cortinovis C, Pizzo F, De Angelis I. Transport of Aflatoxin M(1) in Human Intestinal Caco-2/TC7 Cells. Front Pharmacol. 2012 Jun 11;3:111.
- Caloni F, Stammati A, Frigge G, et al. Aflatoxin M*1 absorption and cytotoxicity on human intestinal in vitro model. Toxicol. 2006 mar; 47(4): 409-415.
- Neal GE, Eaton DL, Judah DJ, et al. Metabolism and toxicity of aflatoxins Mj and B, in human-derived in vitro systems. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1998;151:152-158.
- Shibahara T, Ogawa HI, Ryo H, et al. DNA-damaging potency and genotoxicity of aflatoxin M1 in somatic cells in vivo of Drosophila melanogaster. Mutagenesis. 1995 may;10(3):161-4.
- Pfohl-Leschkowicz A, Manderville RA. An update on direct genotoxicity as a molecular mechanism of ochratoxin A carcinogenicity. Chem Res Toxicol. 2012 Feb 20;25(2):252-62
- Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 2003 Jul;16(3):497-516.
- Etzel RA. What the primary care pediatrician should know about syndromes associated with exposures to mycotoxins. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care. 2006 Sep;36(8):282-305.
- Alvito, PC, Sizoo EA., Almeida CMM, et al. Occurrence of Aflatoxins and Ochratoxin A in Baby Foods in Portugal. Food Analytical Methods. 2010;3(1): 22-30.
- Baydar T, Erkekoglu P, Sipahi H, et al. Aflatoxin B1, M1 and ochratoxin A levels in infant formulae and baby foods marketed in Ankara, Turkey. Journal of Food and Drug Analysis. 2007;15(1):89-92.
- Corcuera LA, Arbilla L, Vettorazzi A, et al. Ochratoxin A reduces aflatoxin B1 induced DNA damage detected by the comet assay in Hep G2 cells. Food Chem Toxicol. 2011 Nov;49(11):2883-9.
- Ruiz MJ, Macáková P, Juan-García A, et al. Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. Food Chem Toxicol. 2011 Oct;49(10):2718-24
- Manderville RA, Pfohl-Leschkowicz A. Bioactivation and DNA adduction as a rationale for ochratoxin A carcinogenesis. World Mycotoxin J. 2008;1:357-367.
- Repetto G, Peso AD, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/ cytotoxicity. Nature Protocols. 2008;3:1125-1131.
- Jonker MJ, Svendsen C, Bedaux JJ, et al. Significance testing of synergistic/ antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture-dose-response analysis. Environ Toxicol Chem. 2005 Oct;24(10):2701-13.