

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ANSARI, H. Etude des conditions fonctionnelles et pathologiques des organes genitaux des brebis a teheran. *Rev. Med. Vet.*, 12 (9): 285-296, 1978.
- 2 - JUBB, K.F. & KENNEDY, P.C. *Pathology of domestic animals*. 2 ed. New York: Academic Press, 1970. v. 2.
- 3 - LYGSET, O. Studies on reproduction in the goat. V. Pathological conditions and mal formations of the genital organs of the goat. *Acta Vet. Scand.*, 9: 364-375, 1968.
- 4 - Mc ENTEE, K. *Reproductive pathology*. Ithaca, N.Y.: State Veterinary College, 1973. 159p. (Course 938. Lectures).
- 5 - ROBERTS, S.J. *Veterinary obstetrics and genital diseases (Therigenology)*. 2. ed. Ithaca, N.Y.: Edwards Brothers, 1971. 776p.
- 6 - SANTA ROSA, J.; SIMPLÍCIO, A.A.; RIERA, G.S.; FOOTE, W.C.; PONCE DE LEON, F.A. Hidrometra em cabras no Nordeste do Brasil. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 10(2): 93-100, 1986.
- 7 - SETTERGREN, I. Physical Examination of the bovine female reproductive system. In: MORROW, D.A. *Current therapy in therigenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980. p. 159-168.
- 8 - SINGH, N. & RAJYA, B.S. Pathology of female reproductive system in goats. *Indian J. Anim. Sci.*, 47: 22-28, 1977.
- 9 - SOUTHCOOT, W.H. & MOULE, G.R. Vulvitis in merino ewes. *Austral. Vet. J.*, 37(8): 291-93, 1961.
- 10 - SMITH, M.C. Caprine reproduction. In: MORROW, D.A. *Current therapy in therigenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1980. p.971-1004.
- 11 - THOMPSON, F.N.; ABRAMS, E.; MILLER, D.M. Reproductive traits in nubian dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.*, 6: 59-65, 1983.

Recebido para publicação em 15/5/1990

End. correspondência: Depto. de Clínicas Veterinárias/CCA

ESTUDO DA CINÉTICA DO CRESCIMENTO CELULAR EM CULTURAS DE CÉLULAS RENAI, TRATADAS COM CITRININA

ALINE ARTIOLI MACHADO YAMAMURA^a
 MARIA HELENA DO CARMO LAGROTA^b
 LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ^c
 MARCO ANTONIO DA ROCHA^a

YAMAMURA, A. A. M.; LAGROTA, M. H. C.; CRUZ, L. C. H.; ROCHA, M. A. – Estudo da cinética do crescimento celular em culturas de células renais, tratadas com citrinina.

RESUMO

O efeito citotóxico da citrinina sobre três linhagens de células renais: LLC-MK₂, PK-15 e MDBK, foi estudado considerando o fato de que o rim é o órgão alvo afetado pela citrinina. A citrinina atuou intensamente sobre o crescimento celular, inibindo-o sobretudo nas primeiras. A cultura de células LLC-MK₂ apresentou um decréscimo acentuado do cultivo tratado com a micotoxina, com 24 horas de incubação. O mesmo ocorreu com os cultivos PK-15 e MDBK, porém com menor intensidade. As afirmações acima mencionadas foram confirmadas através de análise estatística.

PALAVRAS-CHAVE: Citrinina; Citotoxicidade; Cultura de células.

1 – INTRODUÇÃO

Dentre as micotoxinas responsáveis por intoxicações no homem e nos animais, encontra-se a citrinina, que é uma micotoxina produzida por várias espécies de *Penicillium*, incluindo *P. citrinum* e *P. viridicatum*, e por algumas espécies de *Aspergillus* (Saito et al, 1971). É encontrada no trigo, cevada, aveia, centeio, milho, arroz, amendoim e fei-

jão (Scott et al, 1970; Saito et al, 1971; Krogh et al, 1973; Pier, 1981).

A citrinina é uma micotoxina nefrotóxica para todas as espécies animais às quais tem sido administrada, incluindo suínos, cães e animais de laboratório (Ambrose & De Eds, 1946; Sakai, 1955; Tsunoda, 1953; Ramadoss et al, 1973; Carlton e Tuite, 1970; Ames et al, 1976; Roberts et al, 1978; Philips Hayes, 1978; Vesela et al, 1983; Barbosa,

a - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Patol. Animal e Zootecnia/CCA - Universidade Estadual de Londrina

b - Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

c - Instituto de Biologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

1985; Rosa et al, 1985).

A citrinina tem sido encontrada em grãos de cereais, juntamente com a ochratoxina A, causando a nefropatia micotóxica suína (Scott et al, 1972; Krogh et al, 1973), tendo sido correlacionada, também, com intoxicações em bovinos (Pier, 1981).

As manifestações tóxicas no organismo animal, representadas tanto por alterações no padrão metabólico como na eficiência funcional de órgãos específicos, são ainda secundários às alterações que ocorrem dentro da célula. Por este motivo, é de grande importância o estudo das alterações celulares causadas pela citrinina. Neste nível as alterações intracelulares, tanto morfológicas quanto histológicas, podem estar relacionadas ao metabolismo de tecidos específicos. Torna-se possível abranger uma variedade de tecidos e espécies, quando se utiliza cultivos celulares, assim como uma variação de dose em intervalos de tempo que podem ser impraticáveis "in vivo" (Rofe, 1971).

Lompe & Milczewski (1979) utilizando cultivos celulares (três linguagens humanas e duas de suínos), determinaram os efeitos citopáticos, inibição do crescimento celular e as alterações morfológicas produzidas por dezesseis micotoxinas, incluindo a citrinina. Esses autores também observaram que as alterações tóxicas variavam com o tipo de células empregadas.

O objetivo do presente trabalho foi verificar se a citrinina alterava a viabilidade e crescimento celulares.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas três culturas de células de linhagem contínua: LLC-MK₂ - células epitelióides de rim de macaco *Rhesus* (*Macaca mulata*); PK-15 - células epitelióides de rim de suíno (*Sus scrofa*) e MDBK - células epitelióides de rim de bovino (*Bos taurus*).

A citrinina crua obtida de *Penicillium citrinum* Thom, cultivado em meio líquido (Cruz et al, 1982b), foi purificada por cromatografia em mini-coluna com sílica gel S (0,063-0,2 mm) (Cruz & Rosa, 1982a).

A solução estoque de citrinina foi diluída, imediatamente antes do uso, na proporção de 1:10 em meio de Eagle, obtendo-se desta forma uma "solução-mãe" contendo citrinina na concentração de 1000 µg/ml de estreptomina, 100.000 UI/ml de penicilina e 0,025 mg/ml de fungizona. As suspensões celulares (aproximadamente 3 x 10⁵ células/ml) foram distribuídas em tubos 13 x 100 mm.

As células viáveis foram contadas em tempos diferentes, após contato com a mitoxicina, tomando como parâmetro de comparação células cultivadas normalmente (sem a toxina).

A determinação da cinética do crescimento celular baseou-se no método descrito por Roper et al (1976) em que são utilizadas suspensões das diferentes linhagens celulares, contendo aproximadamente 3 x 10⁵ células/ml.

As suspensões continham meio de crescimento com micotoxina na concentração máxima não tóxica: LLC-MK₂ (5 µg/ml), PK-15 e MDBK (10 µg/ml) e meio de crescimento isento de micotoxina (controle de células). Estas suspensões foram distribuídas em tubos de ensaio (13 x 100 mm) e incubadas a 37°C.

A cada 24 horas, após a incubação e durante três dias consecutivos, foram retirados ao acaso, dezoito tubos de cultura de células, sendo que nove deles com crescimento em presença de micotoxina e nove cultivos controle.

A seguir, estas culturas foram tripsinizadas pela adição de 0,5 ml de tripsina/verseno. Logo após a monocamada ter se soltado foi adicionado 0,5 ml de meio de Eagle com 10% de soro bovino. A suspensão foi homogeneizada e retirado um volume de 0,5 ml, ao qual adicionou-se 0,5 ml de eosina a 1%.

A contagem das células viáveis, isto é, aquelas que não se coravam pela eosina a 1%, foi feita em câmara de Neubauer (Lompe et al, 1979; Lorkowski et al, 1980).

Os resultados foram analisados conforme o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = u + T_i + D_j + (TD)_{ij} + E_{ijk}$$

Y_{ijk} = observações das variáveis citadas no tratamento i, no dia j, e interação de tratamento i com dia j.

u = média geral.

T_i = efeito do tratamento i.

$(TD)_{ij}$ = efeito da interação tratamento i no dia j.

D_j = efeito do dia j.

E_{ijk} = erro experimental.

Para estas análises estatísticas foi utilizado o programa AVRPOL (Euclides et al, 1979), que consta de análise de variância e regressão polinomial.

Para o contraste de médias foi utilizado o método de Tukey conforme Gomes, 1987.

3 - RESULTADOS

Os valores das médias estimadas dos controles de células dos cultivos LLC-MK₂, MDBK e PK-15 foram maiores em relação aos valores das médias dos cultivos tratados com citrinina. Este resultado pode ser confirmado pela observação dos respectivos gráficos de cada cultivo (Figuras 1, 2 e 3).

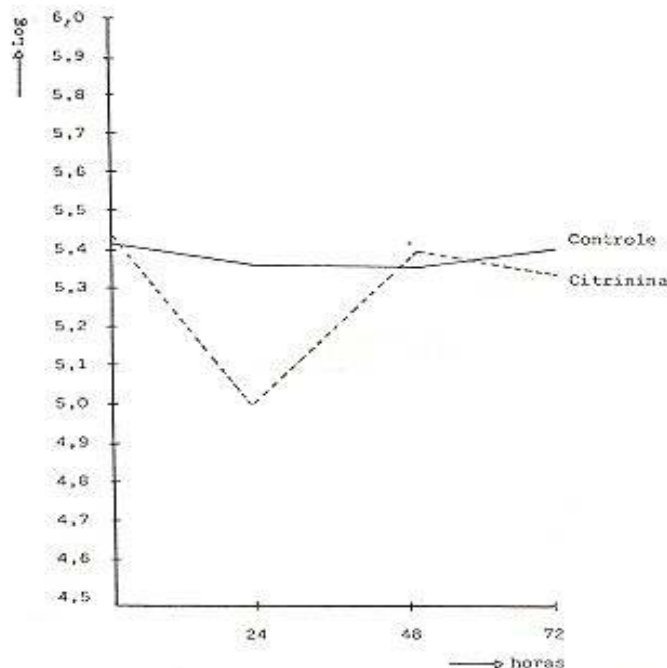


FIGURA 1: Cinética do crescimento celular do cultivo LLC-MK₂ com números de células expressos em logaritmos.

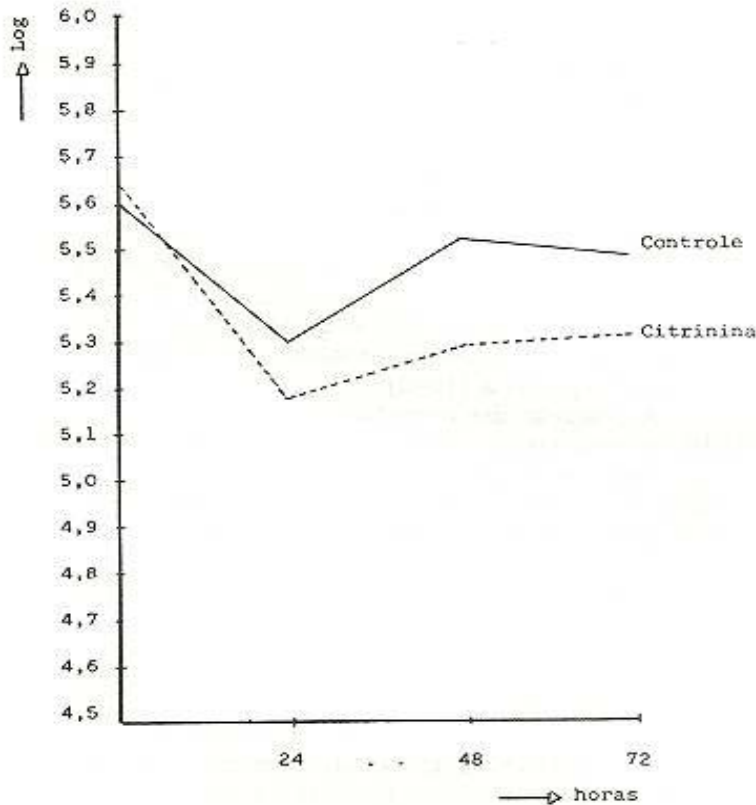


FIGURA 2: Cinética do crescimento celular do cultivo MDBK, com números de células expressos em logaritmos.

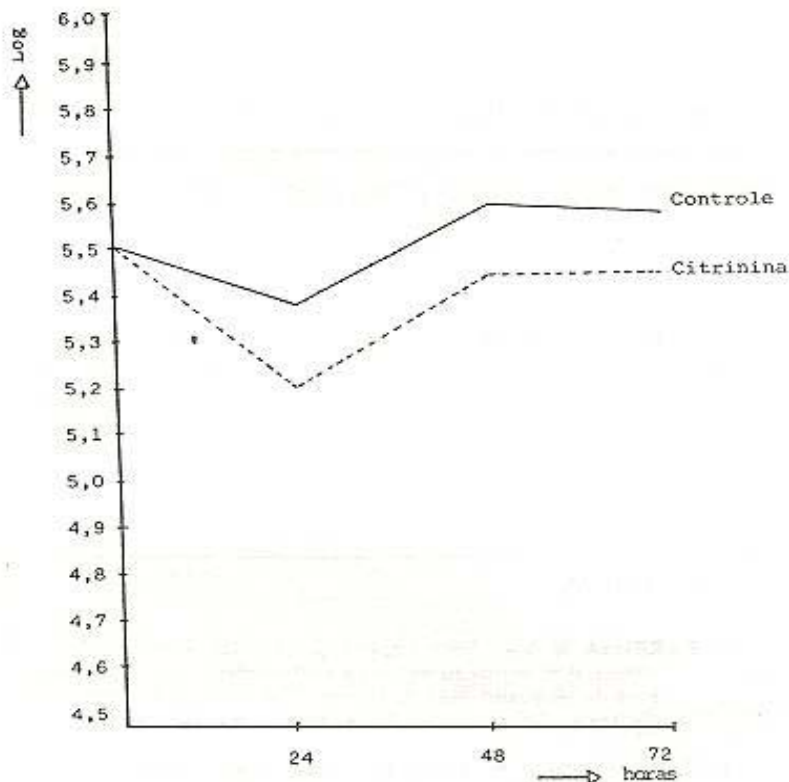


FIGURA 3: Cinética do crescimento celular do cultivo PK-15, com números de células expressos em logaritmos.

Quando realizada a análise de variância, os resultados de interação entre os dois tratamentos (controle e cultivo com citrinina) para os cultivos celulares MDBK e LLC-MK₂ apresentaram significância ao nível de 5% de probabilidade (Tabelas 1 e 2).

Para o cultivo celular PK-15 os resultados da interação entre os tratamentos apresentaram significância ao nível de 1% de probabilidade (Tabela 3).

Os resultados de interação dos intervalos de tempo para cada um dos dois tratamentos apresentaram significância ao nível de 1% de probabilidade para os cultivos MDBK, PK-15 e LLC-MK₂ (Tabelas 1, 2 e 3).

TABELA 1

RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS CONTAGENS DE CÉLULAS DO CULTIVO CELULAR LLC-MK₂ CONTROLE E TRATADO COM CITRININA, NÚMEROS DE CÉLULAS/ml.

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO
tratamento	1	0,198198 *
horas	3	0,381649 **
tratamento x horas	3	0,176090 **
resíduo	64	0,038901

* Significância a nível de 5% de probabilidade
** Significância a nível de 1% de probabilidade

TABELA 2

RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS CONTAGENS DE CÉLULAS DO CULTIVO MDBK E TRATADO COM CITRININA, NÚMEROS DE CÉLULAS/ml

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO
tratamento	1	0,168854 *
horas	3	0,393230 **
tratamento x horas	3	0,029369 n.s.
resíduo	64	0,024136

* Significância a nível de 5% de probabilidade
** Significância a nível de 1% de probabilidade
n.s.: não significativo

TABELA 3

RESUMO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA DAS CONTAGENS DE CÉLULAS DO CULTIVO PK-15 CONTROLE E TRATADO COM CITRININA, NÚMEROS DE CÉLULAS/ml.

FATOR DE VARIAÇÃO	GRAUS DE LIBERDADE	QUADRADO MÉDIO
tratamento	1	0,221315 **
horas	3	0,284075 **
tratamento x horas	3	0,026298 n.s.
resíduo	64	0,025671

** Significância a nível de 1% de probabilidade
n.s.: não significativo

Os resultados de interação dos tratamentos versus intervalos de tempo apresentaram significância ao nível de 5% de probabilidade apenas para o cultivo celular LLC-MK₂ (Tabela 1).

4 - DISCUSSÃO

Segundo as análises estatísticas dos valores das médias estimadas, ocorreu uma redução do crescimento celular nos cultivos celulares PK-15, MDBK e LLC-MK₂ tratados com citrinitina na concentração máxima não tóxica de 10 µg/ml, correspondente aos dois primeiros cultivos e de 5 µg/ml ao terceiro cultivo.

Nas análises de interação entre as culturas de células tratadas e não tratadas, o cultivo PK-15 demonstrou uma inibição do crescimento mais acentuada do que os outros dois cultivos estudados.

Os resultados de interação dos tratamentos versus intervalos de tempo dos cultivos celulares PK-15 e MDBK não revelaram significância com relação aos seus respectivos controles, ou seja, à medida que o tempo em horas, decorreu, o efeito inibidor da citrinitina sobre as células manteve-se constante desde o início.

Nas primeiras horas após a adição de citrinitina, ocorreu uma ação drástica sobre as células cultivadas com uma posterior recuperação tendo sido mantido um crescimento celular paralelo ao controle, mas sempre reduzido em relação a este. Efeito semelhante foi obtido em células de hepatoma tratadas com citrinitina nas concentrações de 2,5 µg/ml e 6,26 µg/ml (Lorkowski et al, 1980), com um decréscimo do número de células logo após a adição da micotoxina, permanecendo o seu número constante nos períodos de incubação subsequentes. Este fato pode ser explicado conforme pesquisa realizada com o cultivo de células de hamster chinês V79-E (Thust & Kneist, 1979), em que as células afetadas pela citrinitina foram capazes de entrar em mitose após uma demora extremamente longa em seu ciclo.

Apenas o cultivo celular LLC-MK₂ apresentou significância nos resultados de interação dos tratamentos versus

intervalos de tempo, denotando que com a duração dos efeitos causados pela micotoxina houve uma ação contínua sobre a capacidade reprodutiva das células cultivadas "in vitro".

Roper et al (1976) consideram que o único critério para detectar a morte celular, nas populações de células em proliferação, é a avaliação da capacidade de reproduzirem-se indefinidamente. A morte celular, segundo os autores, é consequência de interações entre o tipo, a extensão e a duração dos danos causados por um agente, impedindo a reparação dos danos causados às células. A cessação completa da reprodução celular, conseqüente a um efeito citotóxico determinado pela citrinitina (na concentração de 2,5 µg/ml) é causada pela inibição da síntese de ácidos nucleicos e proteínas segundo experimentos realizados por Lorkowski et al (1980) e Creppy et al (1980).

A avaliação das interações dos intervalos de tempo, para cultivos tratados e não tratados, determinou resultados com significância para os três cultivos celulares estudados, indicando que com o passar do tempo tanto as culturas tratadas quanto as não tratadas tinham o seu crescimento inibido. Nas culturas de células controle isto se deve à inibição por contato, que ocorre normalmente em células cultivadas "in vitro" (Dulbecco & Ginsberg, 1979).

5 - CONCLUSÕES

1 - A citrinitina atuou intensamente sobre o crescimento celular, inibindo-o sobretudo nas primeiras horas. A cultura de células LLC-MK₂ apresentou um decréscimo acentuado na média do cultivo tratado com a micotoxina em relação ao seu controle, com 24 horas de incubação. O mesmo ocorreu com os cultivos PK-15 e MDBK, porém com menor intensidade.

2 - As análises estatísticas revelaram que ocorreu uma redução do crescimento celular dos cultivos tratados com a micotoxina nas dosagens máximas não tóxicas de 5 µg/ml para LLC-MK₂ e de 10 µg/ml para PK-15 e MDBK.

YAMAMURA, A. A. M.; LAGROTA, M. H. C.; CRUZ, L. C. H.; ROCHA, M. A. - Study of the celular growth cinetics in kidney all cultures treated with citrinin.

SUMMARY

The cytotoxic effect of citrinin on three renal cells, LLC-MK₂, PK-15 and MDBK, has been studied regarding the fact that the kidney is the target organ affected by citrinin. The citrinin acted intensively on the growth of the cells, inhibiting it mainly in the first hours. There was a decrease of the LLC-MK₂ cell cultivation concerning the cultivation treated with micotoxin after 24 hours of incubation. Although less intensively, the same thing happened to the PK-15 and the MDBK cultivations. The statements mentioned above were confirmed by statistic analyses.

KEY-WORDS: Citrinin; Citotoxicity; Cell culture.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMBROSE, A.M. & DeEDS, F. Some toxicological and pharmacological proprieties of citrinin. *J. Pharmac. Exptl. Ther.*, 88: 173 - 186, 1946.
- 2 - AMES, D.D., WYATT, R.D., MARKS, H.L., WASHUBURN, K.W. Effect of citrinin, a mycotoxin produced by *P. citrinum* on laying hens and young broiler chickens. *Poultry Science*, 55 (4): 1294-1301, 1976.
- 3 - BARBOSA, M.A.S. *Intoxicação experimental em ratos pela citrina: determinação da DL₅₀ e alterações histopatológicas.* Tese de Mestrado, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1985. 65 p. Dissertação (Mestrado).
- 4 - CARLTON, M.W. & TUIITE, J. Nephropathy and edema syndrome induced in miniature swine by corn culture *Penicillium viridicatum*. *Path. Vet.*, 7: 68-80, 1970.

- 5 - CREPPY, E.; LORKOWSKI, G.; BECK, G.; ROSCHENTHALER, R.; DIRHEIMER, G. Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells. *Toxicology Letter*, 5: 375-380, 1980.
- 6 - CRUZ, L.C.H. & ROSA, C.A.R. Otimização da metodologia de extração e purificação de citrinina de cultivos em meio líquido de Czapek-Dox. Anais do XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18, Camboriú, 1982. Anais... Camboriú, 1982a. 420 p.
- 7 - CRUZ, L.C.H., ROSA, C.A.R., CAMPOS, S.G. Produção de citrinina pelo cultivo de *Penicillium citrinum* Thom em meio líquido. Anais do XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 18, Camboriú, 1982. Anais... Camboriú, 1982b. 414 p.
- 8 - DULBECO, R. & GINSBERG, H.S. *Microbiologia de Davis*. 2. ed. São Paulo: Harper & Row do Brasil, 1979.
- 9 - EUCLYDES, R.F. & SILVA, M.A. *Manual de utilização do programa AVRPOL (Análise de Variância e Regressão Polinomial)*. Viçosa: UFV-CPD, Imprensa Universitária, 1979. 10 p.
- 10 - GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 12. ed. Piracicaba: USP, 1987. 467 p.
- 11 - KROGH, P.; HALP, B.; PEDERSEN, V.E. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxin porcine nephropathy. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 81 B: 689-695, 1973.
- 12 - LOMPE, A. & MILCZEWSKI, K.E. von. A cell cultured assay for the detection of mycotoxins. I - Investigations with pure toxins. *Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*, Berlin, 169: 249-259, 1979.
- 13 - LORKOWSKI, G.; CREPPY, E.E.; BECK, G.; DIRHEIMER, G. Inhibitory action of citrinin on cultured hepatoma cells. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 18: 489-491, 1980.
- 14 - PIER, A.C. Mycotoxins and animal health. *Advances in Veterinary Science and comparative Medicine*, 25: 185-241, 1981.
- 15 - PHILLIPS, R.D. & HAYES, A.W. Effect of the mycotoxin citrinin on composition of mouse liver and kidney. *Toxicol. Vet.* 16: 351-359, 1978.
- 16 - RAMADOSS, C.S. & SHANMUGASUNDARAM, E.R.B. Effect of citrinin on liver metabolism in rabbits. *Indian J. Biochem. Biophys.*, 10: 269-297, 1973.
- 17 - ROBERTS, W.T. & MORA, E.C. Toxicity of *Penicillium citrinum**AUA-532 contaminated corn and citrinin in broiler chicks. *Poultry Science*, 57: 1221-1226, 1978.
- 18 - ROFE, P.C. Tissue culture and toxicology. *Fd. Cosmet. Toxicology*, 9: 683-696, 1971.
- 19 - ROPER, P.R. & DREWINKO, B. Comparison of "in vivo" methods to determine drug-induced cell lethality. *Cancer Research*, 36: 2182-2188, 1976.
- 20 - ROSA, C.A.R.; CRUZ, L.C.H.; CHAGAS, W.A.; VEIGA, C.E.M.O. Ocorrência natural de nefropatia micotóxica suína causada pela ingestão de cevada contaminada com citrinina. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 7 (3): 87-90, 1985.
- 21 - SAITO, M.; ISHIKO, T.; ENOMOTO, M.; OHTSUBO, K.; UMEDA, M.; KURUTA, H.; UDAGAWA, S.; TANIGUCHI, S.; SEKITA, S. Screening test using HeLa cells and mice for detection of mycotoxin producing fungi isolated from foodstuffs. *Japan. J. Exp. Med.* 41: 1-20, 1971.
- 22 - SAKAI, F. An experimental study on toxin effect specially on the kidney of "yellow rice" polluted by *Penicillium citrinum* Thom., as well as of citrinin a pigment isolated from the mould. *Acta Societ. Path. Jap.*, 51(5): 413-442, 1955.
- 23 - SCHMIDT, N.J. Tissue culture method for diagnostic virology. In: LENNETTE, E.H.; SCHMIDT, N.J. *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. 4. ed. New York: American Public Health Association, s.d. p. 78-178.
- 24 - SCOTT, P.M.; LAWRENCE, J.W.; WALBEEK, W. von. Detection of mycotoxins by thin layer chromatography: Application to screening of fungal extracts. *Appl. Microbiol.*, 20 (5): 839-842, 1970.
- 25 - SCOTT, P.M.; WALBEEK, W. von; KENNEDY, B., ANYETTI, D. Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and sterigmatocystin and toxigenic fungi in grains and other agricultural products). *Agr. Food, chem.*, 20: 1103-1109, 1972.
- 26 - THUST, R. & KNEIST, S. Activity of citrinin metabolized by rat and human microsomal fractions in clastogenicity and SCE assays on chinese hamster V79-E cells. *Mutation Research*, 67: 321-330, 1979.
- 27 - TSUNODA, H. Study on damage of stored rice, caused by microorganism. III - On yellow rice from Thailand. *F. Inst. Report & Trans. Jap. Phytopathol. Soc.*, 13, p. 3, 1953.
- 28 - VESELA, D.; VESELY, D.; JELINEK, R. Toxic effects of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, on chicken embryos. *Appl. Environmental Microbiology*, 45 (1): 91-93, 1983.

Recebido para publicação em 9/8/90

End. correspondência:
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Patol. Animal e Zootecnia/CCA - UEL