

# CITOTOXICIDADE DA CITRININA PARA CÉLULAS RENAIIS "IN VITRO"

ALINE ARTIOLI MACHADO YAMAMURA<sup>a</sup>  
MARIA HELENA DO CARMO LAGROTA<sup>b</sup>  
LUIZ CELSO HYGINO DA CRUZ<sup>c</sup>

## RESUMO

*Considerando que o rim é o órgão alvo mais afetado pela citrinina, estudamos o seu efeito citotóxico sobre três células de linhagem renais: LLC-MK<sub>2</sub>, PK-15 e MDBK. Após a determinação das concentrações máximas não tóxicas para os três cultivos, empregamos estas dosagens para a avaliação das alterações morfológicas celulares. A cultura de células MDBK demonstrou alterações morfológicas mais distintas, sendo uma das principais a cromatólise (dispersão) do material nuclear.*

**PALAVRAS-CHAVE:** micotoxina, citrinina e citotoxicidade.

## 1 - INTRODUÇÃO

Micotoxina é um termo genérico empregado para caracterizar os metabólitos secundários produzidos por fungos durante o seu crescimento. Em contraste com as toxinas bacterianas que são proteínas e apresentam propriedades antigênicas, as micotoxinas são constituídas de uma variedade de substâncias químicas, com estruturas muito variadas.

Alguns gêneros alimentícios, sob certas condições, podem favorecer o crescimento de fungos com consequente produção de micotoxinas. Devido à relativa estabilidade ao calor e a outros tratamentos de inativação, estas toxinas podem permanecer ativas nos alimentos por longos períodos de tempo, acarretando um grande risco para a saúde humana e animal, particularmente tratando-se da ocratoxina e da citrinina, que são micotoxinas nefropáticas.

Quanto aos efeitos biológicos destas micotoxinas sobre os animais, existem poucas informações, principalmente devido às dificuldades de realizar experimentos com este tipo de hospedeiro. A dificuldade em se trabalhar com animais de grande porte está, não somente, ligada à sua manutenção e ao seu manuseio, como também à necessidade de grandes quantidades de micotoxina a fim de conduzir a uma intoxicação. Por estes motivos procurou-se desenvolver modelos biológicos mais simples, como as culturas de células "in vitro".

As primeiras pesquisas com objetivo de estudar os efeitos de micotoxinas sobre cultivos celulares foram realizados no Japão e, consistiram em testes para triagem de toxicidade. Células HeLa e camundongos foram utilizadas para estudar a ação de contaminantes

de alimentos, entre eles, estavam amostras produtoras de citrinina. Na maioria das vezes, os resultados obtidos com as células HeLa apresentaram um paralelismo com aqueles obtidos em camundongos (SAITO et alii, 1971; SAITO et alii, 1974).

MILCZEWSKI e KRUSCH (1976) estudaram o efeito de várias micotoxinas, incluindo a citrinina, sobre quatro linhagens celulares de origem humana (Girardi Heart, Flow-4000, Detroit 98 e Intestine 407). Demonstraram os efeitos citotóxicos e as alterações citomorfológicas utilizando concentrações sub-letais destas micotoxinas. Constatando que este método apresenta uma grande sensibilidade que só pode ser obtida com animais de laboratório após prolongados estudos.

LOMPE e MILCZEWSKI (1979) utilizando cultivos celulares (três linhagens humanas e duas de suínos), determinaram os efeitos citopáticos, inibição do crescimento celular, e as alterações morfológicas, produzidas por dezesseis micotoxinas, incluindo a citrinina. Também observaram que as alterações tóxicas variavam com o tipo de células hospedeiras.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas três culturas de células de linhagem contínua:

LLC-MK<sub>2</sub> - células epitelióides de rim de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*);

PK-15 - células epitelióides de rim de suíno (*Sus scrofa*);

MDBK - células epitelióides de rim de bovino (*Bos taurus*).

A solução estoque de citrinina foi diluída ime-

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

b - Departamento de Virologia - Universidade Federal do Rio de Janeiro

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

diatamente antes de uso, na proporção de 1:10, em meio de Eagle, obtendo-se desta forma uma "solução-mãe" contendo citrinina na concentração de 1.000  $\mu\text{g/ml}$ .

Os cultivos celulares foram preparados segundo o método de SCHMIDT (1969). Após a tripsinização da monocamada as células foram ressuspensas em meio mínimo essencial de Eagle suplementando com 10% de soro bovino.

A dose máxima de citrinina que não altera a morfologia celular foi determinada segundo o método de WALKER et alii (1971), com algumas modificações. A partir da solução de citrinina com 1.000  $\mu\text{g/ml}$  várias diluições ao dobro foram feitas em meio de manutenção.

Para o estudo das alterações morfológicas das células estas foram cultivadas sobre lamínulas em tubos de Leighton. As células foram coradas com o corante de Wright por 1 minuto.

### 3 - RESULTADOS

As doses máximas não tóxicas para as três linhagens celulares foram de 5  $\mu\text{g/ml}$  para a cultura de células renais de macaco (LLC-MK<sub>2</sub>), e de 10  $\mu\text{g/ml}$  para os cultivos de células renais de suíno (PK-15) e de bovino (MDBK). Os graus de toxicidade classificados de acordo com os estudos de WALKER et alii (1971), com algumas modificações, estão ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Citotoxicidade da Citrinina

Linhagens de células	Citrinina $\mu\text{g/ml}$	Alterações Morfológicas Celulares		
		24 hs	48 hs	72 hs
LLC-MK <sub>2</sub>	5	0	0	0
	10	0	0	+
	20	0	+	++
	40	+	+	++
	80	++	++	++
PK-15	10	0	0	0
	20	0	0	+
	40	0	+	++
	80	++	++	++
MDBK	10	0	0	0
	20	0	0	+
	40	0	+	++
	80	++	++	++

Gráus de toxicidade segundo WALKER et alii (1971) modificado:

0 = nenhum efeito

+ = arredondamento das células

++ = descolamento da monocamada de células

Com a finalidade de melhor visualização do efeito da citrinina sobre as células, estas foram cultivadas em lamínulas que depois foram fixadas, coradas pelo método de Wright e examinadas ao microscópio ótico, sendo realizada uma comparação entre as células controle e as tratadas com citrinina, com 24 horas de incubação.

O cultivo PK-15 controle tinha morfologia característica com células alongadas, com citoplasma homogêneo, núcleo central único e proporcional ao tamanho da célula. O cultivo PK-15 tratado com citrinina, na concentração máxima não tóxica de 10  $\mu\text{g/ml}$ , apresentou diversas alterações, tais como: degeneração vacuolar do citoplasma, células polimorfo-nucleares, células aumentadas de volume, nucléolos arredondados e aumentados de volume, e núcleos com cromatina condensada (picnose).

O cultivo celular MDBK controle (Figura 1) tinha contorno sextavado, núcleo central ovalado, com dois a quatro nucléolos no seu interior, e citoplasma homogêneo. Este cultivo quando tratado com uma concentração máxima não tóxica de citrinina na dose de 10  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 2) apresentou as seguintes alterações: atrofia celular, cromatina nuclear condensada (picnose) e nucléolos arredondados e aumentados de volume.



Figura 1: Cultivo controle de células MDBK.

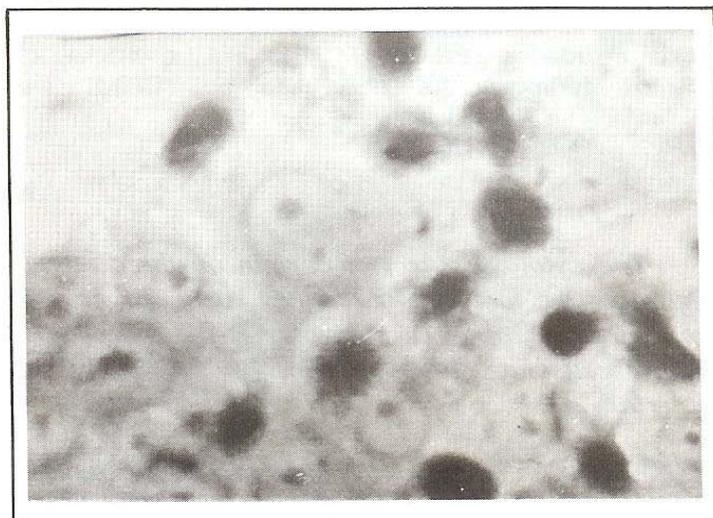


Figura 2: Cultivo MDBK tratado com 10  $\mu\text{g/ml}$  de citrinina.

O cultivo celular LLC-MK<sub>2</sub> controle mostrou uma morfologia caracterizada por contorno sextavado, núcleo central, com um a três nucléolos no seu interior e citoplasma homogêneo. Quando tratado com a concentração máxima não tóxica de 5 µg/ml apresentou: núcleo aumentado de volume, nucléolos arredondados e aumentados de volume e com redução do seu número, nucleoplasma corado com mais intensidade e, cromatina finamente granular.

## 4 - DISCUSSÃO

### 4.1 - DETERMINAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Neste trabalho, estudando esta toxina "in vitro" sobre células renais de macaco (LLC-MK<sub>2</sub>), suíno (PK-15) e bovino (MDBK), constatou-se sua capacidade de alterar a monocamada celular (Tabela 1). Pode-se notar nesta tabela, que as alterações ocorridas foram proporcionais à concentração da citrinina, e que foi acentuada com o tempo de exposição da célula hospedeira.

A cultura de células LLC-MK<sub>2</sub> apresentou uma sensibilidade maior para a toxina, visto que somente na concentração de 5 µg/ml ficou inalterada num período de até 72 horas, enquanto que para as outras linhagens (PK-15 e MDBK) a concentração máxima não tóxica foi de 10 µg/ml. Além disso, pode-se verificar que na concentração de 20 µg/ml, a cultura de células LLC-MK<sub>2</sub> teve sua morfologia alterada, tornando-se arredondadas e houve descolamento da monocamada, respectivamente, no tempo de 48 a 72 horas. Nesta mesma concentração, as culturas de células PK-15 e MDBK só tiveram arredondamento celular no tempo de 72 horas. Resultado semelhante foi obtido por LORKOWSKI et alii (1980) em cultivo celular de carcinoma hepático de rato, nas concentrações de 25 µg/ml e 50 µg/ml de citrinina, num período de incubação de 72 horas.

A maior toxicidade foi representada pelo descolamento total da monocamada de células e foi observada já com 24 horas de incubação numa concentração de 80 µg/ml de citrinina, nos três cultivos de células renais estudados (PK-15, MDBK e LLC-MK<sub>2</sub>). O mesmo fenômeno foi observado por LOMPE e

MILCZEWSKI (1979), em uma concentração de 6 µg/ml de citrinina nos cultivos celulares de coração humano (Girard Heart), de medula de esterno humano (Detroit 98), e nos cultivos FHL (células primárias de fibroblasto de pulmão de embrião humano) e Flow 4.000 clone II (linhagem epitelial de suíno doméstico *Sus scrofa*). Ocorreu o mesmo fenômeno de descolamento da monocamada na dosagem de 200 µg/ml para o cultivo celular AMII (linhagem contínua epitelial originária de rim de porco doméstico).

### 4.2 - ESTUDO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Diversas pesquisas foram realizadas com a finalidade de esclarecer os efeitos de várias micotoxinas sobre a morfologia das células cultivadas "in vitro", porém a literatura não registra nenhuma pesquisa com a micotoxina citrinina em relação a estas alterações.

A vacuolização, observada no citoplasma das células dos cultivos PK-15 e LLC-MK<sub>2</sub>, pode ser consequência de uma infiltração celular por glicogênio, à semelhança das alterações observadas em hepatócitos de suínos intoxicados experimentalmente com 1 mg/Kg/dia de citrinina (ROSA, 1985).

O aumento de volume dos nucléolos, observado nas três culturas de células estudadas, é sinal de que ocorreu continuidade na síntese de RNA. Este tipo de alteração é constantemente encontrado em culturas de células tratadas com micotoxinas, por exemplo: em culturas de células HeLa (células cancerosas de cervix humano) em presença das micotoxinas patulina e ácido penicílico (KAWASAKI et alii, 1972); e em cultura de células HeLa tratadas com nivalenol (UMEDA, 1971).

As alterações da cromatina, representadas por cromatólise observada na cultura de células MDBK, explica a atuação da citrinina inibindo a síntese de RNA e DNA em cultivos de diversas origens (CREPPY et alii, 1980; LORKOWSKI et alii, 1980).

A condensação da cromatina nuclear, observada nas culturas de células PK-15 e MDBK, representa um início de necrose dessas células (UMEDA, 1971).

As observações da ação da citrinina sobre estruturas celulares, tais como membrana citoplasmática, citoplasma e núcleo, permitiram a confirmação do que ocorre "in vivo" (ação nefrotóxica desta toxina).

## ABSTRACT

*The cytotoxic effect of citrinin on three renal cells, i.e. LLC-MK<sub>2</sub>, PK-15 and MDBK has been studied regarding the fact that the kidney is the target organ affected by citrinin. After reaching the highest non-toxic concentrations of three cultivations, the morphological alterations of the cells were observed. The culture of MDBK cells has showed distinct morphological alterations. One of them is the chromolysis of the nuclear material.*

**KEY WORDS:** *micotoxin, citrinin and cytotoxicity.*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – CREPPY, E.; LORKOWSKY, G.; BECK, G.; ROCHENTHALER, R.; DIRHEIMER, G. Combined action of citrinin and ochratoxin A on hepatoma tissue culture cells. *Toxicology Letter*, 5: 357-380, 1980.
- 2 – KAWASAKI, I.; OKI, T.; UMEDA, M.; SAITO, M. Citotoxic effect of penicilic acid and patulin on HeLa cells. *Japan. J. Exp. Med.* 42 (4): 327-340, 1972.
- 3 – LOMPE, A.; MILCZEWSKI, K.E., von. A cell culture assay for the detection of mycotoxins. I – Investigations with pure toxins. *Lebensmittel - Untersuchung und Forschung*, 169 (4): 249-254, 1979.
- 4 – LORKOWSKI, G.; CREPPY, E.E.; BECK, G.; DIRHEIMER, G. Inhibitory action of citrinin on cultured hepatoma cells. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 18: 489-491, 1980.
- 5 – MILCZEWSKI, K.E.V. & KRUSCH, U. Studies on the effect of mycotoxins on cell cultures of human origin: cytomorphological changes in dependence on toxin concentration. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 28 (4): 391-457, 1976.
- 6 – ROSA, C.A.R. *Perfil bioquímico sérico de suínos experimentalmente intoxicados com citrinina*. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, 1985. Tese (Mestre em Ciências).
- 7 – 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.
- 8 – SAITO, M.; ISHIKO, T.; ENOMOTO, M.; OHTSUBO, K.; UMEDA, M.; KURUTA, H.; UDAGAWA, S.; TANIGUCHI, S.; SEKITA, S. Screening test using HeL cells and mice for detection of mycotoxin producing fungi isolated from foodstuffs. An additional report on fungi collected in 1968 and 1969. *Japan. J. Exp. Med.*, 44 (1): 63-82, 1974.
- 9 – SCHMIDT, N.J. Tissue culture method for diagnostic virology. In: *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*. 4. ed. New York, Amer. Public. Health Ass., 1969. p. 78-178.
- 10 – UMEDA, M. Cytomorphological changes of cultured cells from rat liver, kidney and lung, induced by several mycotoxins. *Japan. J. Exp. Med.*, 41: 195-207, 1971.
- 11 – WALKER, W.E.; WISBREN, B.A.; MARTINS, R.R.; BATAYAIS, G.E. A method for determining sensitivities of antiviral drugs “in vitro” for possible use as clinical consultation. *Appl. Microbiol.*, 23: 232-235, 1971.

Recebido para publicação em 16/3/89

## AVALIAÇÃO PRELIMINAR DE INTRODUÇÕES DE BATATA DOCE A PARÂMETROS AGRONÔMICOS E A ASPECTOS COMERCIAIS E CULINÁRIAS<sup>a</sup>

ANTONIO BARBARA DE SOUZA<sup>b</sup>  
TEREZINHA SANDRI<sup>c</sup>

### RESUMO

Com o objetivo de determinar as introduções de batata doce com boas características agronômicas e aspectos comerciais e culinários satisfatórios foi conduzido num ensaio na Estação Experimental de Ponta Grossa-PR, no ano agrícola 86/87. Foram utilizadas 20 introduções selecionadas quanto a produtividade das raízes. A colheita foi realizada aos 245 dias após o plantio sendo avaliados os seguintes parâmetros: população de plantas; produtividade da raiz; tamanho do pedúnculo; cor da película, formato, uniformidade e frequência de raízes comerciais; tempo de cocção e qualidades da polpa cozida. Nas condições deste ensaio as introduções Rio Azul 11, Bolinha, Feira SP, Roxa comum e Agora é nossa se destacaram.

**PALAVRAS-CHAVE:** Batata doce, cultivares, culinária, competição.

a. Os autores agradecem a colaboração de Henrique Valdevino G. da Cruz, Pedro L. Mariano, José Carlos de Araújo, Nilcéa Macedo dos Santos, Mari-  
lene Car e Ana Chacheluk.  
b. Pesquisador da Área de Fitotecnia - Fundação IAPAR/Ponta Grossa-PR.  
c. Extensionista em Bem Estar Social - EMATER/Ponta Grossa-PR.