

Actividad de metabolitos de *Penicillium citrinum* sobre ratones *Mus musculus*

María Cristina Lurá¹, Marta Beatríz Fuentes², Mariana Cabagna², Ana María González¹, Andrea Fabiana Nepote¹, María Cristina Giugni², Marina Rico¹ y María Gabriela Latorre¹

¹Cátedra de Microbiología General y ²Cátedra de Morfología Normal, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas; Universidad Nacional del Litoral, Argentina

Resumen

Los objetivos del presente trabajo fueron estudiar la influencia de metabolitos secundarios de *Penicillium citrinum*, cuando son suministrados con el alimento, sobre el desarrollo de ratones *Mus musculus* y efectuar estudios anátomo-patológicos y bioquímicos a fin de determinar su acción sobre ellos.

Lotes de ratones de ambos sexos, incluyendo hembras preñadas, obtenidos por exocria y seleccionados aleatoriamente fueron alimentados, respectivamente, con alimento fermentado con el hongo, aislado de queso, buen productor de citrinina (LF), alimento mezclado con citrinina (toxina pura) (LC) y alimento comercial sin modificaciones (LT). Todos los animales recibieron comida y agua *ad libitum*.

Semanalmente se controló la evolución de su peso y al cabo de 60 días se sacrificaron para estudiarlos micro y macroscópicamente. En LF y LC, además, se efectuaron análisis hematológicos de rutina y detección de hemosiderina en orina. Después del destete, las crías recibieron dietas idénticas a las de sus progenitores.

Los animales alimentados con la toxina y los alimentados con los metabolitos de *P. citrinum* experimentaron, respecto de LC, una disminución significativa en su desarrollo y alteraciones y depósitos de hemosiderina en algunos de sus órganos. En LC sobrevivieron todas las crías, ninguno de los ratones mostró anomalías macro ni microscópicas en los órganos estudiados y sus parámetros bioquímicos estuvieron dentro de los valores normales. En LF existió menor supervivencia en sus crías e infertilidad atribuible al macho y algunos de sus valores hematológicos fueron sensiblemente más bajos.

Palabras clave

Penicillium citrinum, Toxicidad, Metabolitos, Micotoxinas, Citrinina

Toxic activity of *Penicillium citrinum* metabolites on *Mus musculus* mice

Summary

The aims of this work were to study the influence of secondary metabolites produced by a *Penicillium citrinum* strain. *Mus musculus* mice were fed with a diet containing those metabolites to determine both its influence on their development and the pathological and biochemical changes on experimental animals. Male and female including pregnant females, were studied. One group received commercial feed (A.B.) to which the citrinin-producing mould had been added (LF), another received A.B. contaminated with commercial citrinin (LC). The last group received noncontaminated feed (LT). The animals were weighed weekly, and sacrificed after sixty days, so that they could be studied both macro and microscopically. In LF and LC mice, haematological analysis was carried out and hemosiderin was looked for in urine. The diet of the newborn mice, after weaning, was identical to that of their parent.

The treated animals (LF and LC) showed morphological alterations, a significant decrease in weight and morphologic alterations and hemosiderin granules were detected in some of their organs. In LC all breeds survived, none of the mice showed neither macro nor microscopic anomalies and had normal biochemical parameters. Fewer breeds in LF survived, male infertility was detected and some of their haematological parameters were also measurably lower.

Key words

Penicillium citrinum, Toxicity, Metabolites, Micotoxins, Citrinin

Dirección para correspondencia:

Dra. María Cristina Lurá
Domingo Silva 1980
(3000) Santa Fe, Argentina
Tel.: +54 342 453 7227
E-mail: mclura@fbc.unl.edu.ar;
eocalafell@ciudad.com.ar

Aceptado para publicación el 8 de Octubre de 2001

Los hongos contaminan habitualmente los alimentos y sus materias primas y son capaces de ocasionar un notable deterioro de su calidad. Bajo determinadas condiciones, producen metabolitos secundarios, entre los que se encuentran algunos tóxicos para el hombre y los animales, denominados micotoxinas [1]. Aflatoxinas, ocratoxinas, citrinina, patulina, zearalenona, tricotecenos son las más importantes y frecuentemente estudiadas. En los últimos años se han intensificado los estudios con nuevas toxinas fúngicas tales como las fumonisinas [2], beauvericina y fusaproliferina [3].

Las micotoxinas ocasionan numerosos y variados efectos sobre la salud humana y animal. Se han reportado cuadros de intoxicación aguda y muerte, retardo en el crecimiento, deterioro de la inmunidad y disminución de la eficacia en la reproducción. En la intoxicación crónica, por la ingestión prolongada de pequeñas cantidades de toxina, los síntomas se producen a largo plazo y pueden confundirse con los de otras enfermedades. Según el tipo de toxina de que se trate, entre los cuadros más importantes se han descrito: daño renal, hepatotoxicidad, mutagenicidad, efectos teratogénicos y carcinogenicidad [1].

En Argentina, uno de los hongos que habitualmente contamina los alimentos y cereales es *Penicillium citrinum*, productor de citrinina [4]. En la zona de Santa Fe, esta especie fúngica y la toxina se han detectado frecuentemente en alimentos de consumo humano y animal [5].

Diferentes autores han demostrado que citrinina produce la alteración de la función renal, siendo responsable de la nefropatía porcina y la necrosis tubular del riñón [1,6,7]. También se la ha descrito como capaz de producir mutaciones [8], adenomas renales [9], alteraciones en las mitocondrias de riñón e hígado [10], en el sistema cardiovascular [6] y en la inmunidad [11], como responsable de la disminución del hematocrito y del recuento de plaquetas en ratones [12] y como posible causa de síndrome hemorrágico en ganado bovino [13].

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia sobre el desarrollo de ratones *Mus musculus*, alimentados con metabolitos secundarios de *P. citrinum* y efectuar estudios anatomo-patológicos y bioquímicos a fin de determinar su acción sobre ellos.

MATERIAL Y METODOS

P. citrinum, aislado de queso, identificado según las claves taxonómicas de Pitt [14] y Raper y Thom [15], buen productor de citrinina, fue sembrado en Agar Czapeck e incubado durante 5 días a 30 ± 2 °C. A partir de este cultivo se preparó una suspensión, en agua estéril, de las esporas del hongo (30×10^8 UFC/ml), que se agregó a alimento comercial para ratas, previamente humedecido (30 %) y esterilizado. Se incubó 14 días a 30 ± 2 °C. La fermentación se suspendió por secado en estufa, hasta constancia de peso y se conservó en congelador (-20 °C) hasta su uso.

La verificación y semicuantificación de citrinina en el alimento fermentado, se llevaron a cabo mediante cromatografía en capa delgada (TLC), según lo aconsejado por Scott [16] y Cole y Cox [17]. Se utilizaron cromatofolios Merk Kieselgel 60 y, como testigo, citrinina de origen comercial marca SIGMA, lote 76H404. Las siembras se realizaron por duplicado y se efectuaron pruebas para la confirmación de la toxina [16,17].

Para el ensayo toxicológico se utilizaron ratones *Mus musculus* de ambos sexos, incluidas hembras preñadas, obtenidos por exocria, y seleccionados aleatoriamente, que se distribuyeron en tres lotes, según el tipo de alimento suministrado:

- Lote con alimento fermentado (LF, 15 ratones): 50% Alimento Balanceado comercial (A.B.) sin modificaciones + 50% A.B. fermentado con *P. citrinum* (concentración de citrinina 0,065 mg/100 g de alimento)
- Lote Testigo (LT, 15 ratones): A.B. sin modificar. Se utilizó como control.
- Lote Control (LC, ocho ratones): 50% A.B. sin modificaciones + 50% A.B. con citrinina comercial (en concentración semejante a la que producía el hongo en las condiciones del ensayo y que se suministró al lote F con la dieta).

Todos los animales recibieron alimento y agua *ad libitum*. Las dietas fueron suministradas una vez al día, a razón de 8 g/ratón.

Semanalmente se controló el peso de cada uno de los ratones y se calcularon las medias de los crecimientos a los 60 días. Las crías se pesaron al momento de nacer, al destete y previo al sacrificio. Luego del destete recibieron dietas idénticas a las de sus progenitores. Se consideró depresión en el desarrollo cuando los lotes presentaron, respecto del control, una diferencia en el crecimiento con un $p < 0,05$.

Diariamente se controló la existencia de coluria y el color de las deposiciones. Se efectuaron estudios hematológicos de rutina (hematocrito, recuento de glóbulos blancos y de glóbulos rojos, concentración de hemoglobina y fórmula leucocitaria) y detección de hemosiderina en orina en LF y LT. Al cabo de 60 días se procedió a sacrificar los animales. Se observaron las cavidades torácica y abdominal, y se extrajeron corazón, gónadas, hígado y riñones para su estudio anatómo-patológico. Se realizaron observaciones macroscópicas, cortes por el método de inclusión en parafina y posterior coloración con hematoxilina-eosina, reacción de Perls, coloración para grasas neutras con la técnica de Sudán IV en cortes por congelación e inmunohistoquímica [18,19]. Todos los estudios fueron realizados a "doble ciego".

Se realizó un análisis estadístico mediante la aplicación de pruebas de comparación de medias: ANOVA de un factor y Scheffé [20]. Todos los cálculos estadísticos se realizaron en el Software SPSS 10,0 for Windows.

RESULTADOS

En la figura 1 se puede observar la evolución del peso promedio de los animales adultos a los 60 días. En LF y LC se observó, respecto de LT, una significativa disminución ($p < 10^{-4}$). Sólo se estudió la progenie de los lotes LT y LF. En el lote control sobrevivieron todas las crías y en LF sobrevivió menos del 50 %; las muertes se produjeron durante la lactancia o inmediatamente después del destete. La evolución de sus pesos desde el destete hasta su sacrificio se observa en la figura 2, habiéndose detectado diferencias significativas ($p < 10^{-4}$) entre los pesos de LT y LF, al momento del destete y a su muerte.

Realizados los exámenes anatómo-patológicos, macroscópicamente los riñones y los corazones de los ratones de LF presentaron mayor tamaño, pero las gónadas masculinas y femeninas resultaron más pequeñas, sin que se hubieran detectado diferencias estadísticamente significativas. Los hígados en LF mostraron zonas hemorrágicas, no observadas en LT y LC. Las figuras 3, 4 y 5 permiten observar algunas de las alteraciones detectadas.

Las observaciones microscópicas realizadas en los órganos estudiados se sintetizan en la tabla 1. Los corazones y gónadas femeninas no mostraron anomalías.

En cuanto a los estudios bioquímicos realizados, se hallaron diferencias significativas ($p < 10^{-4}$) entre los valores de hematocrito y de hemoglobina de los lotes T y F.

Tabla 1. Alteraciones microscópicas detectadas en riñón, hígado y gónadas masculinas.

Lotes	Riñón	Hígado	Gónadas masculinas
LT	Sin alteración	Sin alteración	Sin alteración
LF	Congestión cortical y medular Hemosiderina en tubo proximal	Congestión Hemosiderina intrahepatocítica Esteatosis* Degeneración hidrópica* Necrosis hepatocítica* Células de Kupffer estimuladas**	Degeneración Testicular***
LC	Congestión cortical y medular Hemosiderina en tubo proximal	Congestión Hemosiderina intrahepatocítica	****

*Compatible con hepatitis tóxica.

**Hipertrofia e hiperplasia, indicadores de la activación del sistema mononuclear fagocítico.

***De moderada a severa. Células multinucleadas de degeneración testicular. Túbulos seminíferos con epitelio cúbico. No existen espermatozoides.

****No se estudiaron.

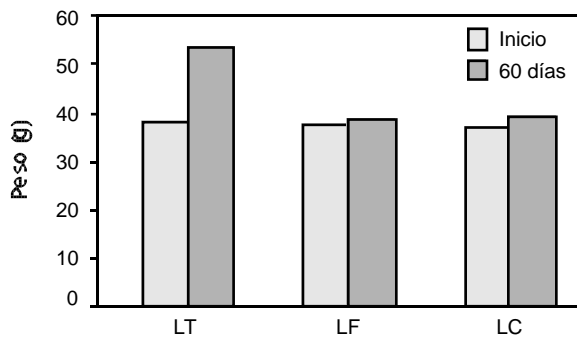


Figura 1. Evolución del peso promedio de los ratones adultos a los 60 días ($p < 10^{-4}$).

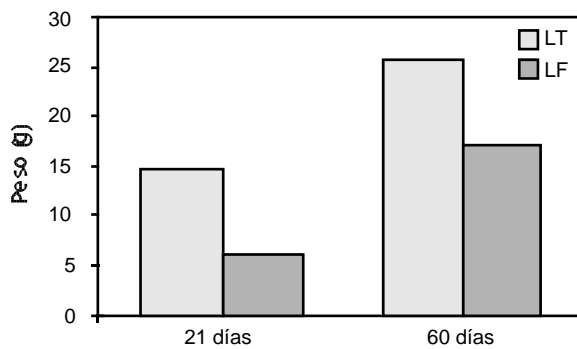


Figura 2. Evolución del peso de las crías de LT y LF desde el destete hasta su sacrificio ($p < 10^{-4}$).

El resto de los parámetros hematológicos estuvieron dentro de los límites normales. Se detectó hemosiderina en el sedimento urinario de los ratones de LF, no habiéndose observado coluria.

DISCUSIÓN

La inclusión del lote alimentado con citrinina de origen comercial (LC) permitió comparar sus efectos con los que producían los metabolitos de *P. citrinum* sobre los ratones utilizados. Las diferencias observadas en la evolución de los pesos entre los lotes estudiados, coinciden con lo relatado por Hald [7] y Schlosberg y col. [21] quienes describieron retraso en el crecimiento y síntomas de anorexia en animales alimentados con citrinina. Experiencias previas, realizadas en la ciudad de Santa Fe [22], con

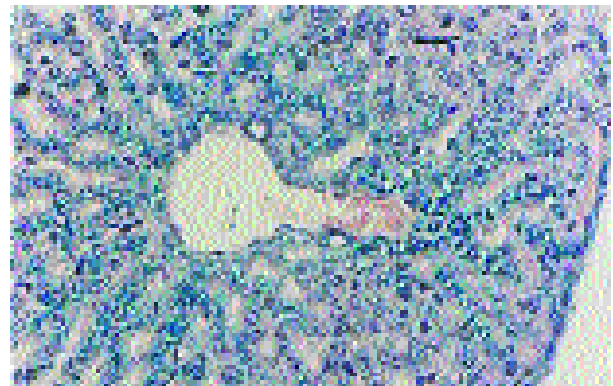


Figura 3. Hemosiderina en espacio portal y parénquima hepático. Reacción de Perls. Hematoxilina- Eosina (400x).



Figura 4. Esteatosis centrolobulillar. Coloración Sudán IV; Hematoxilina- Eosina (100x).

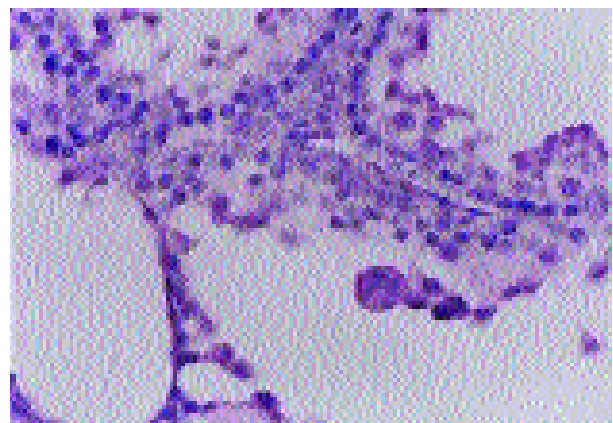


Figura 5. Degeneración testicular. Hematoxilina- Eosina (400x).

pollitos controlados hasta los 30 días de edad, arrojaron resultados similares.

Se ha descrito que citrinina es nefrotóxica, produce poliuria [7] y es causa de injuria y muerte celular en el túbulo proximal renal [6]. La mayoría de los investigadores coinciden en que la citrinina no ejerce su acción sobre los túbulos distales ni sobre el glomérulo. En el presente estudio, a pesar de no haberse encontrado signos de alteración en las células parenquimatosas, se observaron fenómenos vasculares tanto en los glomérulos como en la médula renal.

La congestión observada en hígado y riñón, podría ser interpretada como el inicio de un cuadro inflamatorio debido a un irritante químico como pueden ser algunas toxinas microbianas.

Los cortes histológicos de los hígados de los animales de LF, presentaron esteatosis, degeneración hidrópica subcapsular, necrosis hepatocítica e hipertrofia del sistema kupfferiano, compatibles con los fenómenos tóxicos que se producen en una hepatitis alcohólica aguda [23].

Por otra parte, en los hígados de los animales alimentados con las dietas que contenían citrinina comercial (LC) y con el alimento fermentado con el hongo (LF), se detectó hemosiderina en el parénquima de la zona portal. Este hallazgo, que indicaría una sobreoferta de hierro, no se debería al alimento balanceado (A.B.) por cuanto no fue detectado en el hígado de los ratones pertenecientes a LT. Este hecho, sumado a la presencia de hemosiderina en túbulo proximal y a la hemosiderinuria, permiten suponer

que existiría un cuadro de hemólisis intravascular. Si bien en la bibliografía consultada, son escasas las referencias sobre la actividad hemolítica *in vivo* producida por la citrinina [12,13]. Por otra parte, algunos extractos de *P. citrinum* que contenían citrinina produjeron, en ensayos de laboratorio, la hemólisis de glóbulos rojos humanos [24]. La descripción de casos de intoxicaciones crónicas con presencia de hemosiderosis sin ictericia [23], justificaría la ausencia de coluria.

A pesar de que en los ovarios de las hembras pertenecientes a LF se detectaron folículos ováricos en distintos estadios de maduración y cuerpos amarillos, lo que indicaría que existió ovulación, las mismas no volvieron a preñarse. Este hecho podría ser atribuido a los hallazgos en los testículos de los machos correspondientes, cuyos epitelios seminíferos presentaban indicios de degeneración sin desarrollo completo, careciendo de espermatozoides.

Se concluye que los animales de experimentación, alimentados con *P. citrinum*, buen productor de citrinina, manifestaron disminución de su desarrollo, menor sobrevivencia en las crías e infertilidad atribuible al macho; también presentaron alteraciones en los valores hematológicos y depósito de hemosiderina en algunos de sus órganos y en la orina. Estos últimos resultados permitirían suponer que, *in vivo*, la citrinina podría ocasionar un cuadro patológico compatible con una hepatitis de origen tóxico y/o hemólisis intravascular.

A la Universidad Nacional del Litoral, por haber subsidiado parte del trabajo (Subsidio CAID'2000).

Bibliografía

- Council for Agricultural Science and Technology. Mycotoxins. Economic and health risks. Iowa, Task Force Report, 1989.
- Dalcero A, Magnoli C, Chiacchiero S, et al. Mycoflora and incidence of Aflatoxin B₁, Zearalenone and Deoxynivalenol in poultry feeds in Argentina. Mycopathol 1997; 137: 179-184.
- Kostecki M, Wisniewska H, Perrone G, et al. The effects of cereal substrate and temperature on production of beauvericin, moniliformin and fusarroliferin by *Fusarium subglutinans* ITEM-1434. Food Additives and Contaminants 1999; 16: 361-365.
- Bressler G, Brizzio SB, Vaamonde G. Mycotoxin-producing potential of fungi isolated from amaranth seeds in Argentina. Int J Food Microbiol 1995; 25: 101-108.
- Lurá MC, González AM, Basílico JC, Caffer MI. Hongos contaminantes del sorgo utilizado en la elaboración de alimentos balanceados para aves. Estudio de la capacidad toxicogénica de los mismos. Rev Fac Ing Química Univ Nac del Litoral 1982; XLV: 35-39.
- Berndt W. Effects of selected fungal toxins on renal function. En: Hooks JB, Goldstein RS (Eds.) Toxicology of the kidney. New York, Raven Press Ltd, 1993.
- Hald B. Porcine nephropathy in Europe. I A R C Sci Publ. 1991; 115: 49-56.
- Leifer Z, Kada T, Mandel M, Zeiger E, Stattford R, Rosenkranz ES. An evaluation of test using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. Mutat Research 1981; 87: 211-297.
- Arai M, Hibino T. Tumorigenicity of citrinin in male F344 rats. Cancer Lett 1983; LI: 281-287.
- Chagas GM, Oliveira BM, Campello AP, Kluppel ML. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III Effect on renal cortical and liver mitochondrial swelling. J Appl Toxicol 1995; 15: 91-95.
- Pestka JJ, Bondy GS. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. Can J Physiol Pharmacol 1990; 68: 1009-1016.
- Gupta M, Sasmal D, Bandyopadhyay S, Bagchi G, Chatterjee T, Dey S. Hematological changes produced in mice by Ochratoxin A and Citrinin. Toxicol 1983; 26: 55-62.
- Griffiths IB, Done SH. Citrinin as a possible cause of the pruritis, pyrexia, haemorrhagic syndrome in cattle. Vet Rec 1991; 129: 113-117.
- Pitt JI, Hodking AD. Fungi and food spoilage. Maryland, Aspen Publishers Inc, 1999.
- Raper K, Thom C. A manual of the *Penicillia*. Baltimore, Williams and Wilkins Co, 1949.
- Scott PM. Detection of mycotoxins by thin layer chromatography: Application to screening of fungal extracts. Appl Microbiol 1970; 20: 839-842.
- Cole R, Cox R. Handbook of toxic fungal metabolites. New York, Academic Press, 1981.
- Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sabin LH. Métodos histotecnológicos. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), 1993.
- García del Moral R. Laboratorio de anatomía patológica. Madrid, Interamericana Mc Graw Hill, 1993.
- Walpole R, Myers R. Probabilidad y Estadística. México DF, Mc Graw-Hill, 1991.
- Schlossberg A, Bellaiche M, Handji V, et al. Lead toxicosis in a captive bottlenose dolphin consequent ingestion of air gun pellets. J Wild Dis 1997; 33: 135-139.
- Lurá MCE, Basílico JC. Capacidad toxicogénica de hongos contaminantes de alimentos para aves. La Ind Cárnica Latinoam 1984; 53: 28-32.
- Robbins SL, Cotran RS. Pathologic basis of disease. México DF, Nueva Edit Interamericana, 1994.
- González AM, Lurá MC, Latorre MG, Rico M, Carrera E, Lound, F. Estudio de la actividad hemolítica *in vitro* de extractos de hongos productores de citrinina. FABICIB. Univ Nac del Litoral 1998; 2: 127-130.