

Toxinas da *Alternaria* em géneros alimentícios: uma preocupação ao nível da saúde pública

Alternaria toxins in foodstuffs: a public health concern

Beatriz Guerreiro^{1,2}, Célia Ventura^{1,3}, Henriqueta Louro^{1,3}, Maria João Silva^{1,3}

beatriz.guerreiro@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Departamento de Ciências da Vida, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa, Caparica, Portugal

(3) Centro de Toxicogenómica e Saúde Humana, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade NOVA de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

As toxinas da *Alternaria* são metabolitos secundários produzidos por fungos do género *Alternaria*, que são agentes patogénicos e saprófitas comuns das plantas, com a capacidade de crescer numa ampla gama de temperaturas e níveis de humidade. Deste modo, estão amplamente distribuídos no ambiente e são contaminantes prevalentes em produtos agrícolas a nível mundial, causando danos pré e pós-colheita em frutas, vegetais, cereais e grãos. Apesar de causarem perdas económicas relevantes e representarem um risco para a saúde humana e animal, até ao momento não há uma caracterização adequada dos perigos associados a estas micotoxinas emergentes. Neste artigo apresenta-se um resumo da literatura referente aos efeitos tóxicos destas micotoxinas ao nível do fígado, com ênfase nos estudos de citotoxicidade e genotoxicidade. Estes estudos toxicológicos sugerem que micotoxinas da *Alternaria* podem induzir a perda da viabilidade celular e danos do DNA nas células hepáticas humanas.

_Abstract

Alternaria mycotoxins are secondary metabolites produced by black moulds of the genus *Alternaria*, which are common plant pathogens and saprophytes that can grow in a wide range of temperatures and moisture levels. Thus, they are widely distributed in the environment, and are prevalent contaminants of food and feed worldwide, causing pre- and post-harvest damage to agricultural products, such as fruits, vegetables, cereals and grains. Despite causing relevant economic losses and posing a risk to the health of humans and animals, there is a lack of proper hazard characterization for these emergent mycotoxins. This article aims to summarize data on these mycotoxins, focusing on hepatic cytotoxicity and genotoxicity. These toxicological studies suggest that *Alternaria* mycotoxins may induce loss of cell viability and DNA damage in human hepatocytes.

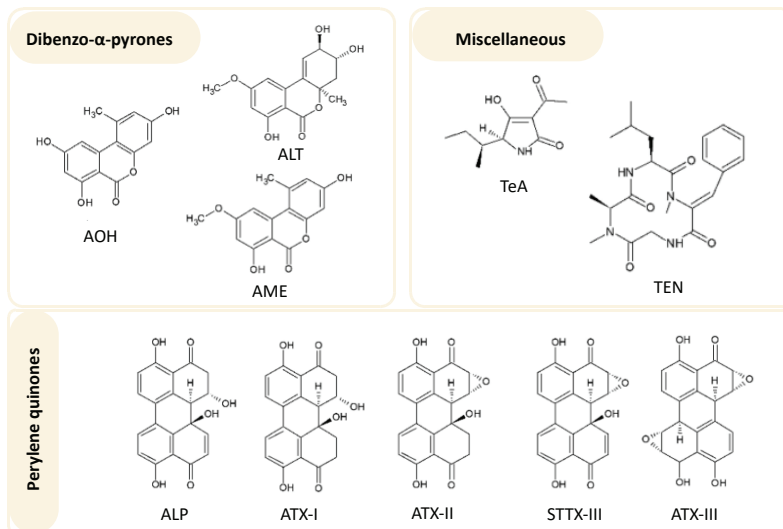
_Exposição humana a micotoxinas da *Alternaria*

Os fungos do género *Alternaria* vivem como saprófitas, parasitas ou em simbiose com plantas e animais, sendo a maioria das espécies patogénicas para plantas, podendo infetar mais de 4000 plantas hospedeiras (1). Graças à sua capacidade de sobrevivência numa ampla gama de temperaturas e níveis

de humidade, estes fungos crescem em praticamente todas as condições ambientais e estão amplamente distribuídos na natureza. Algumas espécies são comumente encontradas no solo, ar ou em ambientes interiores. Assim, os seus esporos podem ser isolados de vários habitats diferentes. Além disso, os fungos *Alternaria* têm a capacidade de produzir mais de 70 metabolitos secundários, que são formados em condições específicas no campo, durante o armazenamento, transporte ou processamento de produtos alimentares, designadamente, cereais, grãos, frutas e vegetais (2). Deste modo, são responsáveis pela contaminação pré e pós-colheita de produtos alimentares. Alguns destes metabolitos estão quimicamente caracterizados e apresentam estruturas muito diversas. Estas refletem propriedades biológicas distintas e podem pôr em risco a saúde humana e animal, sendo por isso considerados micotoxinas. As micotoxinas da *Alternaria* mais documentadas na literatura são o alternariol (AOH), éter monometílico de alternariol (AME), o altenueno (ALT), alterperilenol (ALP), altertoxinas I, II, e III (ATX-I, -II e -III), a stemfilitoxina III (STTX-III), o ácido tenuazóico (TeA), e por fim a tentoxina (TEN) (1). Estas toxinas são geralmente agrupadas de acordo com a sua estrutura química (figura 1).

Na década de 90, foi observado que em regiões da China com alto índice de cancro do esófago, se verificava uma maior contaminação por *Alternaria alternata* em grãos, sugerindo que as micotoxinas produzidas podem ser um fator contribuinte para o desenvolvimento do cancro nessas áreas (3). Tendo em conta que a exposição a estas micotoxinas ocorre, sobretudo, através da ingestão de alimentos contaminados, torna-se crucial estabelecer limites máximos para a sua ocor-

Figura 1: Estruturas e grupos químicos das toxinas da *Alternaria* mais relevantes.



Alterariol (AOH), éter monometílico de alterariol (AME), altenueno (ALT), alterperilenol (ALP), altertoxinas I, II e III (ATX-I, -II e -III), stemfilitoxina III (STTX-III), ácido tenuazóico (TeA), tentoxina (TEN).

rência em produtos alimentares. Em 2011, a EFSA publicou um parecer científico sobre os riscos para a saúde pública relacionados com a presença de toxinas da *Alternaria* em alimentos e rações, tendo sido definida uma dose de preocupação toxicológica (*threshold of toxicological concern*, TTC) de 2,5 ng/kg peso corporal/dia para a AOH e AME, e de 1500 ng/kg peso corporal/dia para a TeA. Adicionalmente, foi estimada a exposição alimentar crónica em adultos, tendo-se concluído que a população vegetariana está mais sujeita à exposição por micotoxinas da *Alternaria*, uma vez que a sua alimentação é baseada em produtos de origem vegetal (4).

A avaliação de risco das micotoxinas é essencial para a proteção da saúde humana e compreende diversas componentes, sendo uma delas a identificação e caracterização do perigo. No entanto, apesar de as toxinas da *Alternaria* causarem perdas económicas relevantes e representarem um risco para a saúde humana e animal, os perigos associados à sua exposição ainda não se encontram devidamente caracterizados. Uma revisão recente descreve os potenciais impactos para a saúde associados a estas toxinas e identifica lacunas no conhecimento (5).

A absorção de micotoxinas através do consumo de alimentos contaminados resulta, frequentemente, em danos ao nível do fígado que levam à hepatotoxicidade. Adicionalmente, o fígado é o principal órgão de destoxificação, sendo responsável pela biotransformação dos xenobióticos. Por este motivo, constitui um dos principais órgãos de interesse aquando da avaliação dos potenciais riscos associados micotoxinas (6).

_Objetivo

Com o presente artigo pretende-se resumir o estado da arte da literatura relativa à hepatotoxicidade das micotoxinas da *Alternaria*, com foco principal em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade, para fornecer uma visão geral dos dados existentes. Adicionalmente, pretende-se alertar a comunidade para o potencial impacto da exposição a estas micotoxinas na saúde humana.

_Toxicidade *in vitro* e *in vivo*

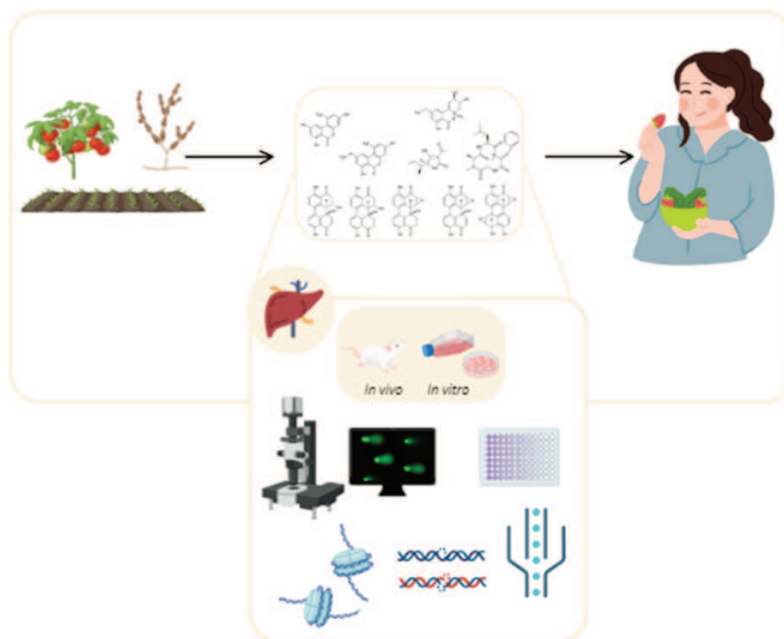
Embora não haja uma caracterização adequada dos perigos associados a estas micotoxinas emergentes, os estudos toxicológicos realizados nos últimos anos permitem uma primeira abordagem aos potenciais riscos relativos a hepatotoxicidade (figura 2).

Até à data, existem apenas estudos *in vivo* relativos ao AOH, AME e ATX-I. Por exemplo, num estudo em ratos NMRI expostos oralmente ao AOH, não foram identificadas lesões no DNA extraído de tecido hepático (7). Em estudos mais recentes em ratos Sprague Dawley, a administração oral de AOH não causou quebras no DNA nas células do fígado, tendo-se colocado a hipótese de tal se dever à baixa biodisponibilidade sistémica do AOH. No entanto, a análise de secções histopatológicas revelou danos citotóxicos ao nível do fígado, designadamente sinais de inflamação, inchaço e retenção de gordura nos hepatócitos (8). Por outro lado, o AME e ATX-I induziram quebras no DNA do fígado destes ratos, revelando o potencial genotóxico destas toxinas (9-10).

Os estudos *in vitro* recorrem a modelos celulares hepáticos e são essenciais para uma primeira compreensão dos efeitos exercidos por micotoxinas (11). Os modelos mais frequentemente utilizados são a linha celular hepática proliferativa, HepG2, e a linha celular hepática diferenciada, HepaRG.

Diversos estudos demonstraram o potencial citotóxico das toxinas da *Alternaria* na linha celular HepG2, nomeadamente o AOH, AME, ALP e TeA (12-14). Adicionalmente, a sensibilidade das células hepáticas aparenta ser superior à de outros tipos celulares, suportando a possibilidade de o fígado ser um órgão-alvo destas micotoxinas (15-17). Por outro lado, o estado de proliferação e diferenciação das células hepáticas pode ser um fator de suscetibilidade, bem como a sua capacidade celular de metabolização de xenobióticos (12).

Figura 2: ⚡ Exposição humana às micotoxinas da *Alternaria* via géneros alimentícios e estudos toxicológicos ao nível do fígado, realizados até à data.



Ensaios de genotoxicidade que incluem o ensaio do cometa e a fosforilação da histona γ -H2AX; Ensaios de citotoxicidade baseados em citometria de fluxo e ensaios colorimétricos.

Relativamente ao potencial genotóxico destas micotoxinas, alguns estudos revelaram que o AOH, o AME, ATX-II e STTX-III induzem quebras nas cadeias de DNA em células HepG2 (12,18). Observou-se também uma diferença na reparação das quebras no DNA provocadas pelo AOH e as pirelenoquinonas, sendo que os danos provocados pela ATX-II e STTX-III foram mais persistentes (19). O pré-tratamento das células com um sistema de ativação metabólica resultou na destoxificação destas toxinas, o que novamente sugere que a capacidade metabólica das células seja um fator de influência nos efeitos tóxicos provocados por estas toxinas. Para as toxinas TeA e TEN não foram observados efeitos genotóxicos, com e sem metabolização exógena (12).

No âmbito da Parceria Europeia para a Avaliação de Riscos dos Químicos (PARC; <https://www.eu-parc.eu/>) estas toxinas foram consideradas como substâncias prioritárias, pelo que serão conduzidos diversos estudos com o objetivo de preencher as lacunas no conhecimento e contribuir para a identificação e caracterização dos perigos associados a estes contaminantes alimentares emergentes, apoiando a sua avaliação de risco e regulamentação.

Conclusões

As micotoxinas da *Alternaria* têm despertado cada vez mais interesse ao nível da saúde pública, em parte porque são contaminantes prevalentes numa grande variedade de produtos alimentares, mas também pelo facto de não haver uma caracterização adequada dos perigos associados a estas micotoxinas emergentes, principalmente ao nível de um dos seus principais órgãos-alvo, o fígado.

Os estudos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* têm vindo a revelar o potencial citotóxico e genotóxico destas toxinas, e reforçam a necessidade de estudos adicionais que permitam não só melhorar a avaliação do risco associado à exposição, mas também às agências regulatórias competentes estabelecer valores limite para a ocorrência destas toxinas em alimentos.

Financiamento:

Trabalho parcialmente financiado pelo *Centre for Toxicogenomics and Human Health* – ToxOmics (UIDB/00009/2020; UIDP/ 00009/2020).

Referências bibliográficas:

- (1) Pinto VE, Patriarca A. *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods Mol Biol.* 2017;1542:13-32. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_2
- (2) Ostry V. *Alternaria* mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs. *World Mycotoxin J.* 2008;1(2):175-188. <https://doi.org/10.3920/wmj2008.x013>
- (3) Liu GT, Qian YZ, Zhang P, et al. Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. In: O'Neill IK, Chen J, Bartsch H. (eds). *Relevance to human cancer of N-nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins.* Lyon, France: IARC, 1991, pp. 258-262.
- (4) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal.* 2011;9(10):1-97. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2407>
- (5) Louro H, Vettorazzi A, López de Cerain A, et al. Hazard characterization of *Alternaria* toxins to identify data gaps and improve risk assessment for human health. *Arch Toxicol.* 2024 Feb;98(2):425-469. <https://doi.org/10.1007/s00204-023-03636-8>
- (6) Gu X, Manautou JE. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. *Expert Rev Mol Med.* 2012 Feb 3;14:e4. <https://doi.org/10.1017/S1462399411002110>
- (7) Schuchardt S, Ziemann C, Hansen T. Combined toxicokinetic and *in vivo* genotoxicity study on *Alternaria* toxins. *EFSA Supporting Publications.* 2014;11(11). <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2014.en-679>
- (8) Miao Y, Wang D, Chen Y, et al. General toxicity and genotoxicity of alternariol: a novel 28-day multi-endpoint assessment in male Sprague-Dawley rats. *Mycotoxin Res.* 2022 Nov;38(4):231-241. <https://doi.org/10.1007/s12550-022-00466-y>
- (9) Tang X, Chen Y, Zhu X, et al. Alternariol monomethyl ether toxicity and genotoxicity in male Sprague-Dawley rats: 28-Day *in vivo* multi-endpoint assessment. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2022 Jan;873:503435. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503435>
- (10) Zhu X, Chen Y, Tang X, et al. General toxicity and genotoxicity of altertoxin I: A novel 28-day multiendpoint assessment in male Sprague-Dawley rats. *J Appl Toxicol.* 2022 Aug;42(8):1310-22. <https://doi.org/10.1002/jat.4297>
- (11) Ruan H, Lu Q, Wu J, et al. Hepatotoxicity of food-borne mycotoxins: molecular mechanism, anti-hepatotoxic medicines and target prediction. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2022;62(9):2281-2308. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1960794>
- (12) Hessel-Pras S, Kieshauer J, Roenn G, et al. *In vitro* characterization of hepatic toxicity of *Alternaria* toxins. *Mycotoxin Res.* 2019 May;35(2):157-168. <https://doi.org/10.1007/s12550-018-0339-9>
- (13) Juan-García A, Juan C, König S, et al. Cytotoxic effects and degradation products of three mycotoxins: alternariol, 3-acetyl-deoxynivalenol and 15-acetyl-deoxynivalenol in liver hepatocellular carcinoma cells. *Toxicol Lett.* 2015 May 19;235(1):8-16. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.03.003>
- (14) Wang Y, Liu HX, Chen YC, et al. Two New Metabolites from the Endophytic Fungus *Alternaria* sp. A744 Derived from *Morinda officinalis*. *Molecules.* 2017 May 8;22(5):765. <https://doi.org/10.3390/molecules22050765>
- (15) den Hollander D, Holvoet C, Demeyere K, et al. Cytotoxic Effects of Alternariol, Alternariol Monomethyl-Ether, and Tenuazonic Acid and Their Relevant Combined Mixtures on Human Enterocytes and Hepatocytes. *Front Microbiol.* 2022 Apr 22;13:849243. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.849243>

Referências bibliográficas:

- (16) Vejdovsky K, Sack M, Jarolim K, et al. In vitro combinatory effects of the *Alternaria* mycotoxins alternariol and altertoxin II and potentially involved miRNAs. *Toxicol Lett.* 2017 Feb 5;267:45-52. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.011>
- (17) Mahmoud MM, Abdel-Razek AS, Soliman HSM, et al. Diverse polyketides from the marine endophytic *Alternaria* sp. LV52: Structure determination and cytotoxic activities. *Biotechnol Rep (Amst)*. 2021 May 24;33:e00628. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00628>
- (18) Pfeiffer E, Eschbach S, Metzler M. *Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells in vitro. *Mycotoxin Res.* 2007 Sep;23(3):152-7. <https://doi.org/10.1007/BF02951512>
- (19) Fleck SC, Sauter F, Pfeiffer E, et al. DNA damage and repair kinetics of the *Alternaria* mycotoxins alternariol, altertoxin II and stemphytoxin III in cultured cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2016 Mar;798-799:27-34. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2016.02.001>