

Caraterização *in vitro* dos efeitos tóxicos da patulina na integridade do epitélio intestinal e potenciais efeitos protetores da cisteína

In vitro characterization of patulin toxic effects on intestinal epithelial integrity and potential cysteine protective effects

Ricardo Assunção¹⁻³, Carla Martins¹, Mariana Ferreira^{1,4}, Paula Alvito^{1,3}

ricardo.assuncao@insa.min-saude.pt

(1) Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Instituto de Investigação e Formação Avançada, Universidade de Évora, Évora, Portugal

(3) Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

(4) Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

_Resumo

A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelas micotoxinas presentes nos alimentos, sendo a patulina, uma micotoxina produzida por fungos do género *Penicillium* spp., uma preocupação particular atendendo a que a exposição humana a esta micotoxina pode conduzir a efeitos imunológicos, neurológicos e gastrointestinais. Considerando estes efeitos para a saúde, o presente estudo tem como objetivos a avaliação do efeito tóxico da exposição intestinal a patulina, bem como a determinação do potencial efeito protetor da coadministração de patulina e cisteína na membrana intestinal, utilizando para o efeito células Caco-2. A integridade da membrana intestinal foi determinada pela medição da resistência elétrica transepitelial (TEER). Os resultados evidenciaram um decréscimo acentuado nos valores de TEER após 24 horas de exposição celular a 95 µM de patulina. Para as concentrações mais reduzidas verificou-se uma redução máxima inferior a 25% após 24 horas de exposição. A coadministração de patulina (95 µM) e cisteína (40 µM) revelou um decréscimo nos valores de TEER. O tratamento com cisteína em concentrações superiores (≥400 µM) revelou efeito protetor da membrana intestinal, tendo em conta os valores de TEER. Estes resultados contribuem para uma avaliação do risco mais precisa associada à exposição a contaminantes alimentares.

_Abstract

The intestinal mucosa is the first biological barrier encountered by mycotoxins potentially present in foods. Patulin, a mycotoxin produced by fungi of genera *Penicillium*, constitutes an especial concern considering the immunological, neurological and gastrointestinal effects resulting from human exposure. The present work aims to evaluate the intestinal membrane toxic effects occurring after exposure to patulin and the potential protective effects of co-administration of cysteine, using Caco-2 cells. The membrane integrity was determined by evaluation of transepithelial electrical resistance (TEER). Results showed a marked decrease of TEER values after 24 hours of exposure to 95 µM of patulin. For lower concentrations, a TEER reduction below 25% after 24 hours of exposure was verified. Co-administration of patulin (95 µM) and cysteine (40 µM) revealed a TEER decrease. For higher cysteine concentrations (≥400 µM), a protective effect of the intestinal membrane was verified. These results contribute to a more accurate food contaminants risk assessment.

_Introdução

O trato gastrointestinal constitui uma importante barreira que separa o interior do corpo humano do ambiente externo, estando diretamente envolvido no metabolismo e transporte de substâncias endógenas e exógenas (1). A mucosa intestinal é a primeira barreira biológica encontrada pelas toxinas presentes na dieta, podendo assim ser exposta a teores elevados destes contaminantes presentes nos alimentos, nomeadamente, as micotoxinas (2,3). As micotoxinas são metabolitos secundários tóxicos de baixo peso molecular produzidos por fungos e representam uma preocupação crescente no domínio da saúde pública. Esta preocupação deve-se essencialmente à toxicidade crónica associada a estes compostos (4). O trato gastrointestinal é a via mais frequente para a exposição a contaminantes alimentares, sendo que os efeitos das micotoxinas na integridade da barreira intestinal deverão ser bem conhecidos e caraterizados. Apesar das centenas de compostos já identificados, as micotoxinas que se consideram de maior importância para a saúde pública são as aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, fumonisinas, zearalenona e o grupo dos tricotecenos (5).

A patulina, uma micotoxina produzida por fungos do género *Penicillium* spp. durante o processo de deterioração da fruta, representa uma preocupação particular uma vez que a exposição humana a esta micotoxina pode resultar em toxicidade aguda ou crónica, descrevendo-se como potenciais efeitos de exposição os efeitos imunológicos, neurológicos e gastrointestinais (3). Considerando estes efeitos para a saúde, afigura-se de maior importância um completo entendimento do efeito desta micotoxina na estrutura e função da mucosa intestinal.

artigos breves_ n. 6

A utilização de metodologias *in vitro* que permitam uma melhor compreensão do comportamento dos contaminantes alimentares no trato gastrointestinal tem despertado um interesse crescente nos últimos anos. Neste sentido, a utilização de culturas de células, nomeadamente células Caco-2, permite uma aproximação ao ambiente do epitélio intestinal humano, constituindo uma ferramenta importante para o estudo dos efeitos da exposição intestinal a micotoxinas, nomeadamente a patulina (6).

A prevenção e/ou redução dos efeitos adversos causados pelas micotoxinas quer nos animais quer para o Homem representa também um assunto de importância crucial, dado o potencial impacto que poderá representar para a proteção da saúde humana.

_Objetivos

O presente estudo tem como objetivos a avaliação do efeito tóxico da exposição intestinal a patulina, bem como a determinação do potencial efeito protetor da coadministração de patulina e cisteína na membrana intestinal.

_Material e métodos

Os efeitos da exposição a patulina e os potenciais efeitos protetores da coadministração de patulina e cisteína foram aferidos pela caracterização dos seus efeitos *in vitro* na integridade da membrana intestinal, utilizando para o efeito células Caco-2, uma linha celular que constitui um dos modelos celulares *in vitro* mais utilizados para o estudo dos efeitos intestinais de contaminantes químicos. Estas células foram adquiridas à *American Tissue Culture Collection* (ATCC) e mantidas em crescimento em atmosfera de 5% dióxido de carbono a 37°C. As condições para diferenciação das células, desenvolvimento da monocamada de células intestinais Caco-2 e ensaio da integridade da membrana foram realizados de acordo com as condições descritas por Brand e colaboradores, 2010 (7). Por forma a obter uma monocamada de células intestinais diferenciadas (apresentando polos apical e basolateral) as células foram cultivadas em placas de 12 poços de policarbonato com *inserts* (Costar, Corning®) com 0,4 µm de poro. Os ensaios para determinação da integridade da membrana intestinal foram efetuados

após 18 a 21 dias de cultura, por forma a garantir a correta diferenciação das células e a obtenção de monocamada.

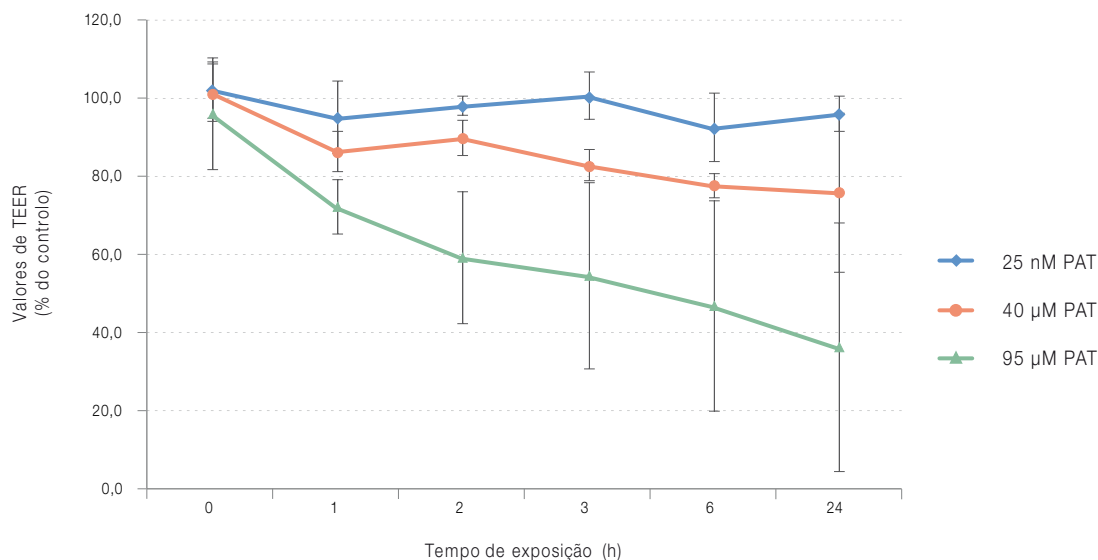
A integridade da membrana após exposição a patulina foi determinada pela medição da resistência elétrica transepitelial (TEER) utilizando para o efeito o equipamento Millicell® ERS Voltohmmeter e testando três concentrações crescentes de patulina diferentes: 25 nM (concentração próxima da exposição real humana através da ingestão de alimentos consumidos na Europa, segundo Majerus e Kapp, 2002) (8), 40 µM e 95 µM. A TEER foi avaliada às 0, 1, 2, 3, 6 e 24 horas exposição. Nos ensaios de coadministração, adicionaram-se três concentrações de cisteína (VWR, Portugal) (40, 400 e 4000 µM) para a mais elevada concentração de patulina testada (95 µM).

_Resultados e discussão

Os resultados evidenciaram um decréscimo acentuado (80%) nos valores de TEER após 24 horas de exposição celular a 95 µM de patulina, sendo que este decréscimo se iniciou após 1 hora de exposição. Para as concentrações mais reduzidas (25 nM e 40 µM) verificou-se uma redução máxima inferior a 25% após 24 horas de exposição, conforme expressa a [gráfico 1](#). Estes resultados revelam-se concordantes com os estudos realizados por alguns autores, sugerindo que a patulina altera a função da barreira do epitélio intestinal, nomeadamente através da alteração das *tigh junctions*, apesar deste fenómeno não estar ainda totalmente esclarecido (9-11).

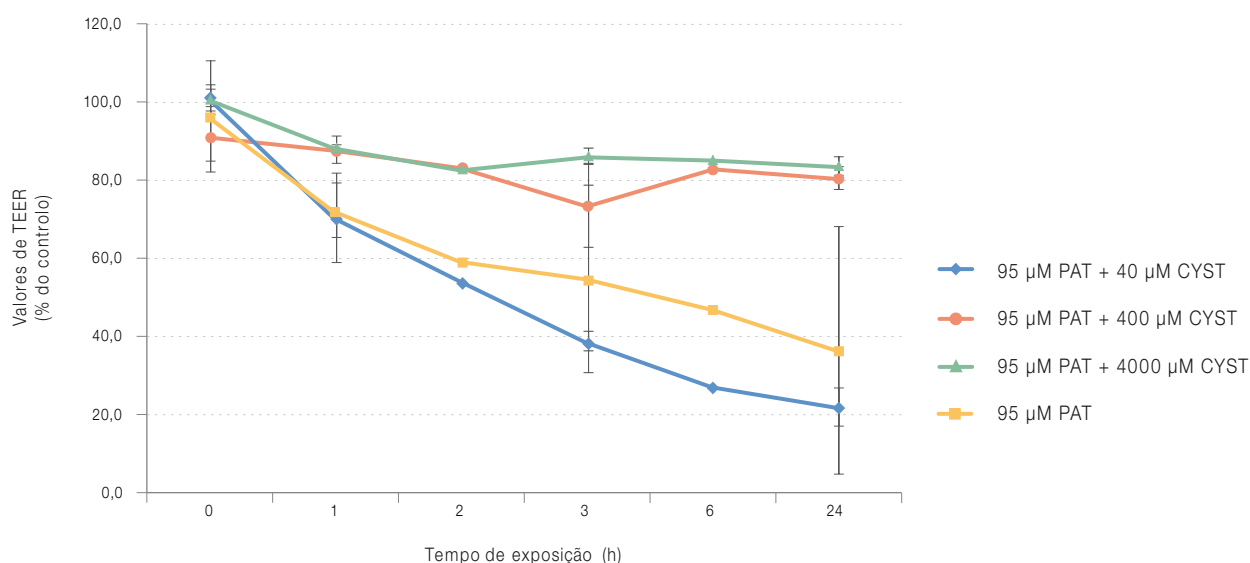
A coadministração de patulina (95 µM) e cisteína (40 µM) revelou um decréscimo nos valores de TEER, contrastando de forma estatisticamente significativa, com os resultados obtidos aquando do tratamento com cisteína em concentração igual ou superior a 400 µM, nos quais não se observaram alterações nos valores de TEER ([gráfico 2](#)). Melo e colaboradores, 2012 (12) estudaram *in vivo* os potenciais efeitos protetores da N-acetilcisteína na degradação do ADN dos órgãos de rato após exposição intraperitoneal a patulina, tendo verificado um efeito protetor dos danos oxidativos motivados por esta toxina, e concordantes com o que foi obtido no presente estudo.

Gráfico 1: Efeito da exposição da monocamada de células Caco-2 a diferentes concentrações de patulina ao longo de 24 horas: 25 nM (n = 2), 40 µM (n = 3) e 95 µM (n = 4).



Os resultados representam a variação na resistência elétrica transepitelial (TEER) relativamente ao controlo (patulina, 0 µM) após 24 horas de exposição e correspondem à média das percentagens de TEER ± DP (desvio padrão).

Gráfico 2: Efeito da coadministração de patulina (95 µM) e cisteína na resistência elétrica transepitelial (TEER) da monocamada de células Caco-2 a diferentes concentrações de cisteína ao longo de 24 horas: 40 µM (n = 2), 400 µM (n = 2) e 4000 µM (n = 2).



Os valores representam a variação na TEER relativamente ao controlo (patulina, 0 µM) após 24 horas de exposição.

Os resultados apresentam a média dos valores de percentagem (do controlo) de TEER ± DP (desvio padrão).

A significância estatística foi avaliada pelo teste *Wilcoxon signed rank test*, comparando os resultados das diferentes concentrações de cisteína e evidenciando $p < 0,05$ para as concentrações de 400 µM e 4000 µM.

Conclusões

O presente estudo sugere que a exposição das células Caco-2 a patulina reduz a integridade da barreira da monocamada epitelial do intestino, o que poderá ser minimizado com a co-administração de 400 ou 4000 µM de cisteína.

A utilização de células Caco-2 revela-se assim muito útil na avaliação dos possíveis efeitos da exposição a patulina, nomeadamente no estudo dos mecanismos de ação decorrentes da exposição do intestino a contaminantes alimentares. Estes resultados disponibilizam uma abordagem preliminar ao processo de absorção e transporte que ocorre após o processo de digestão de alimentos contaminados com micotoxinas, contribuindo para uma avaliação do risco mais precisa associada à exposição a contaminantes alimentares.

Financiamento:

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projeto "MycoMix" (PTDC/DTP-FTO/0417/2012) e CESAM: UID/AMB/50017/2013, ambos financiados pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).

Artigo baseado em:

Assunção R, Ferreira M, Martins C, Diaz I, Padilla B, Dupont D, Bragança M, Alvito P. Applicability of in vitro methods to study patulin bioaccessibility and its effects on intestinal membrane integrity. *J Toxicol Environ Health A*. 2014;77(14-16):983-92.

Referências bibliográficas:

- (1) Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(3):141-53.
- (2) Pinton P, Oswald IP. Effect of deoxynivalenol and other Type B trichothecenes on the intestine: a review. *Toxins (Basel)*. 2014;6(5):1615-43. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4052256/
- (3) Puel O, Galtier P, Oswald IP. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins (Basel)*. 2010;2(4):613-31. Review. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3153204/
- (4) Kuiper-Goodman T. Food safety: mycotoxins and phycotoxins in perspective. In: Miraglia M, van Edmond H, Brera C, et al. (eds.). *Mycotoxins and phycotoxins—developments in chemistry, toxicology and food safety*. Fort Collins, CO: Alaken, 1998, pp. 25-48.
- (5) Yang J, Li J, Jiang Y, et al. Natural occurrence, analysis, and prevention of mycotoxins in fruits and their processed products. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2014;54(1):64-83.
- (6) Turco L, Catone T, Caloni F, et al. Caco-2/TC7 cell line characterization for intestinal absorption: how reliable is this in vitro model for the prediction of the oral dose fraction absorbed in human? *Toxicol In Vitro*. 2011;25(1):13-20. Epub 2010 Aug 21.
- (7) Brand W, Padilla B, van Bladeren PJ, et al. The effect of co-administered flavonoids on the metabolism of hesperetin and the disposition of its metabolites in Caco-2 cell monolayers. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(6):851-60.
- (8) Majerus P, Kapp K. Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States: report on tasks for scientific cooperation: report of experts participating in Task 3.2.8. Brussels: Directorate General Health and Consumer Protection, 2002. http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.8_en.pdf
- (9) Mohan HM, Collins D, Maher S, et al. The mycotoxin patulin increases colonic epithelial permeability in vitro. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(11):4097-102.
- (10) McLaughlin J, Lambert D, Padfield PJ, et al. The mycotoxin patulin, modulates tight junctions in caco-2 cells. *Toxicol In Vitro*. 2009;23(1):83-9. Epub 2008 Oct 29.
- (11) Mahfoud R, Maresca M, Garmy N, et al. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002;181(3):209-18.
- (12) de Melo FT, de Oliveira IM, Greggio S, et al. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(10):3548-55. Epub 2011 Dec 23.