

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CLINICHE E FARMACO-TOSSICOLOGICHE  
VETERINARIE (*Curriculum farmaco-tossicologico*)  
XIX CICLO**



Tesi di Dottorato

***Valutazione degli effetti di diverse fusariotossine sul sistema  
immune: studio in vitro su cellule Jurkat e linfociti di suino.***

Dott.ssa Diomira Luongo

Docente Guida  
Prof.ssa Lorella Severino

Coordinatore  
Prof. Angelo Persechino

Anno Accademico 2005 / 2006

# INDICE

	<b>pag.</b>
<b>Premessa e Scopo del lavoro</b>	3
<b>1 – INTRODUZIONE</b>	4
<b>Micotossine oggetto dello studio</b>	5
<b>1.1 Fumonisina B1</b>	5
<b>1.2 Zearalenone</b>	6
<b>1.3 Deossinivalenolo e Nivalenolo</b>	8
<b>2 – MATERIALI E METODI</b>	10
<b>2.1 Reagenti</b>	10
<b>2.2 Micotossine</b>	10
<b>2.3 - 1° sistema cellulare: cellule T Jurkat</b>	11
<b>2.3a</b> coltura cellulare	11
<b>2.3b</b> test proliferazione cellulare	11
<b>2.3c</b> misurazione dell' apoptosi	12
<b>2.3d</b> test di citotossicità	12
<b>2.3e</b> dosaggio mRNA di specifiche citochine	13
<b>2.3f</b> analisi statistica	14
<b>2.4 - 2° sistema cellulare: linfociti di suino</b>	15
<b>2.4a</b> animali	15
<b>2.4b</b> test di proliferazione linfocitaria	15
<b>2.4c</b> analisi statistica	16

	<b>pag.</b>
<b>3 – RISULTATI</b>	
–Cellule Jurkat	
3.1 Influenza di FB1 e $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione	17
3.2 Effetto di $\alpha$ -ZEA sulla vitalità cellulare	18
3.3 Effetto di FB1 e $\alpha$ -ZEA sulla espressione degli mRNA di citochine	19
3.4 Influenza della co-incubazione FB1 + $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione	21
3.5 Influenza della co-incubazione FB1 + $\alpha$ -ZEA sulla espressione di citochine	22
3.6 Effetto di NIV e DON sulla proliferazione	23
3.7 Effetto di NIV e DON sulla vitalità cellulare	24
3.8 Effetto di NIV e DON sulla espressione di citochine	26
–Linfociti di suino	
3.9 Influenza della concanavalina A sulla proliferazione	27
3.10 Influenza di FB1 e $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione	29
3.11 Influenza di NIV e DON sulla proliferazione	30
3.12 Effetti della co-incubazione FB1 + $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione	31
3.13 Effetti della co-incubazione NIV + DON sulla proliferazione	32
<b>4 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI</b>	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>40</b>

## **Premessa**

La contaminazione degli alimenti da parte delle micotossine sta assumendo, in questi ultimi anni, un'importanza sempre più crescente in considerazione essenzialmente di due fattori: da una parte l'impatto che tali sostanze hanno sulla salute sia dell'uomo che degli animali, dall'altra la frequenza con cui si ritrovano su prodotti di largo consumo quali cereali (frumento, mais, orzo, segale e prodotti derivati) ma anche cacao, caffè, spezie, vino, e tanti altri ancora. La portata di tale problematica ci viene fornita da dati della FAO (Food and Agriculture Organization) secondo cui circa il 25% della produzione alimentare mondiale risulta contaminato da almeno una micotossina. (Heussner et al., 2006).

### **Scopo del lavoro**

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di valutare gli effetti immunomodulatori di quattro fusariotossine, fumonisina B1 (FB1), alfa-zearalenolo ( $\alpha$ -ZEA), nivalenolo (NIV) e deossinivalenolo (DON), su specifiche funzioni immuni attraverso l'utilizzo di due differenti modelli sperimentali: cellule Jurkat e linfociti di suino. Oltre che sull'attività delle singole micotossine, l'attenzione è focalizzata, in particolare, sulle possibili interazioni tra più fusariotossine, ciò al fine di riproporre, negli studi *in vitro*, condizioni sperimentali quanto più prossime alle situazioni di campo.

# 1 - INTRODUZIONE

Le micotossine sono metaboliti secondari di origine fungina, la cui produzione da parte del fungo può avvenire o direttamente sul campo, in particolari condizioni di stress per la pianta (siccità, carenza di minerali nel suolo, etc.), oppure in un secondo momento, quando il raccolto viene stoccato e si vengono a creare particolari condizioni di umidità e di temperatura. Per esempio, il *Fusarium spp.* è un tipico fungo da campo, comunemente ritrovato sul raccolto (Gutleb et al., 2002); raramente, però, si riscontra dopo sei settimane di stoccaggio del prodotto e il suo posto viene preso da *Aspergillus* e *Penicillium*. Tuttavia, le micotossine prodotte da *Fusarium spp.*, principalmente durante la fase di coltivazione, persistono nel prodotto stoccato. La formazione delle micotossine è, infatti, strettamente connessa alla crescita fungina anche se la presenza di funghi tossigeni in un alimento non indica necessariamente presenza di micotossine. D'altronde, le micotossine possono persistere per lungo tempo dopo la morte del fungo produttore. Pertanto, l'assenza di muffe non è indice dell'assenza di micotossine (Hussein et al., 2001).

Fino ad oggi, sono state isolate e caratterizzate circa 300 micotossine, tra queste, le fusariotossine, prodotte da miceti appartenenti al genere *fusarium*, sono solo alcune tra quelle di maggior interesse medico ed agro-economico.

Alle micotossine vengono attribuiti numerosi effetti tossici tra cui proprietà mutagene, cancerogene e teratogene. Inoltre, risulta di particolare rilevanza la capacità di alcune micotossine di alterare la normale risposta immune anche quando esse sono presenti negli alimenti a livelli inferiori a quelli necessari per la manifestazione dei sintomi clinici di micotossicosi (Oswald et al., 2005).

Molte micotossine, ad esempio i tricoteceni, deprimono il sistema immunitario e ciò rende l'organismo più sensibile nei confronti di patologie di tipo infettivo ed infestivo e crea le condizioni predisponenti per la riacutizzazione di processi morbosi ad andamento cronico.

Negli animali da reddito, esposizioni anche a basse dosi, condizione che si riscontra frequentemente in natura, determinano anoressia, calo delle *performances* produttive e riduzione dell'incremento ponderale (Charoenpornsook et al., 1998). I ruminanti, in

genere, sono meno sensibili rispetto ai monogastrici poiché la flora batterica e protozoaria presente nel rumine è in grado di effettuare una parziale detossificazione attraverso reazioni di de-acetilazione e de-epossidazione di questi composti tossici prima del loro assorbimento (Hussein et al., 2001).

Mentre, però, gli effetti immunomodulatori esercitati da molte micotossine sono stati dimostrati sia *in vivo* (Bondy e Pestka, 2000) che *in vitro* (Berek et al., 2001), pochi sono stati gli studi finora compiuti per valutare gli effetti tossici esercitati da più micotossine presenti contemporaneamente nello stesso substrato alimentare, condizione questa molto frequente per le fusariotossine.

## 1. Micotossine oggetto dello studio

### 1.1 Fumonisina B1

Le fumonisine sono micotossine prodotte da funghi appartenenti al genere *Fusarium* come *F. verticilloides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* e *F. nygamai*. Dal punto di vista chimico, esse sono caratterizzate da una lunga catena idrocarburica simile alla sfingosina che è responsabile della tossicità di questi composti.

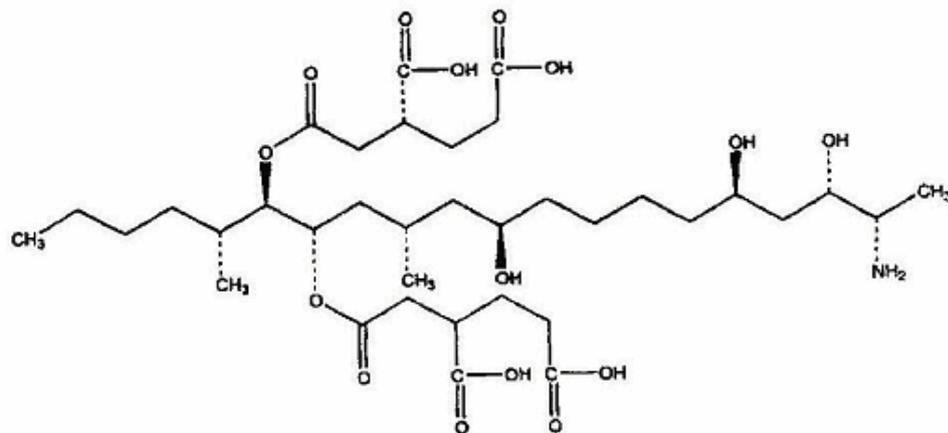


Figura 1. Struttura della fumonisina B1

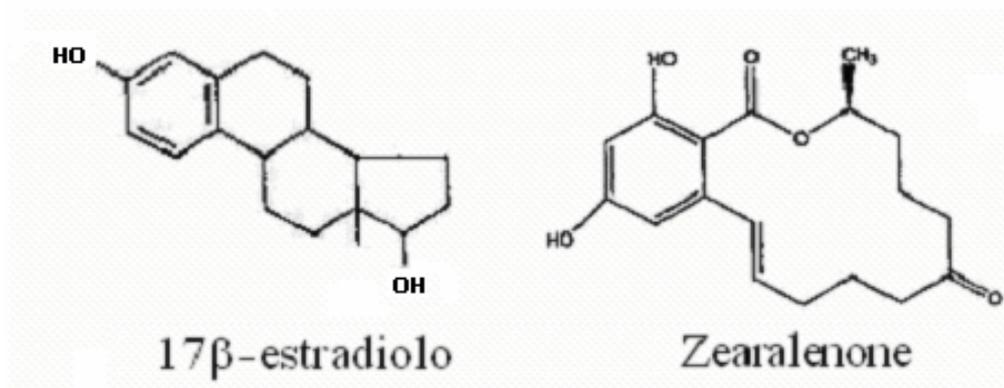
La fumonisina B1 (Fig. 1) è la fumonisina a cui vengono attribuiti i maggiori effetti tossici ed è frequentemente rinvenuta come contaminante nei cereali. Essa è implicata nell'eziologia di diverse tossicosi specie-specifiche, riscontrate in animali domestici come l'edema polmonare nel suino (Colvin et al., 1992), la leucoencefalomalacia nel cavallo (Kellerman et al., 1990) e fenomeni di nefro- ed epato-tossicità nei roditori (Gelderblom et al., 1991); essa è stata, inoltre, associata all'insorgenza del cancro esofageo nell'uomo (Marasas et al., 1995; Abnet et al., 2001). Effetti neurotossici sono stati, inoltre, descritti nel topo dove la micotossina, attraverso una riduzione dell'utilizzazione dell'acido folico da parte dell'embrione, causerebbe un ritardo nello sviluppo del tubo neurale (Marasas, 2004).

Gli effetti fisiopatologici della FB1 sono da attribuire all'alterazione del metabolismo degli sfingolipidi, in quanto questa micotossina è un inibitore della ceramide sintasi, enzima-chiave nella sintesi di tali composti (Ramasamy et al., 1995; Yoo et al., 1996). La ceramide e i glicosfingolipidi sono importanti siti di riconoscimento e molecole coinvolte nella trasduzione del segnale durante la risposta immune cellulo-mediata. La FB1 influenza diverse molecole implicate nel *signalling* come la protein chinasi C (PKC), coinvolta in numerosi pathways di trasduzione del segnale, tra cui l'induzione delle citochine, la carcinogenesi e l'apoptosi (Merrill et al., 1997; Gopee et al., 2004). Per quanto riguarda gli effetti della FB1 sul sistema immune i dati presenti in letteratura sono alquanto controversi: la FB1 causa immuno-soppressione nel pollo (Li et al., 2000), nel suino (Harvey et al., 1995) e nel bovino (Osweiler et al., 1993) mentre nei roditori induce immuno-stimolazione (Dombrink-Kurtzman et al., 2000; Dresden-Osborne et al., 2002; Sharma et al., 2004).

## **1.2 Zearalenone**

Lo zearalenone (ZEA) è un metabolita secondario prodotto da funghi quali *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* che si ritrova soprattutto nel mais e prodotti derivati. Lo ZEA è un lattone macrociclico, con una struttura molto simile

al 17 $\beta$  - estradiolo (Fig. 2) e ciò gli conferisce un'elevata affinità di legame ai recettori per gli estrogeni.



**Figura 2.** Struttura del 17 $\beta$  -estradiolo e dello zearalenone.

E' stato osservato che lo ZEA causa effetti estrogenici nel suino (Diekman e Green, 1992), ed è stato ipotizzato un suo ruolo nella riduzione di fertilità e diminuzione della produzione lattea nei bovini (D'Mello e Mc Donald, 1997). Sono stati, inoltre, documentati casi di pubertà precoce in bambine del Porto Rico, tra il 1978 e 1981, molto probabilmente dovuti al consumo di alimenti (carne e vegetali) contaminati dalla micotossina, anche se tali studi non sono stati confermati dalla Food and Drug Administration (FDA). Effetti estrogenici sono stati attribuiti anche ai derivati alcolici dello ZEA come l' $\alpha$ -zearalenolo,  $\alpha$ -zearalanolo e il  $\beta$ -zearalenolo (Cheeke, 1998). E' noto che il sistema immunitario è un potenziale organo bersaglio per i distruttori endocrini estrogenici, in quanto i recettori per gli estrogeni sono presenti anche in varie cellule immunocompetenti (Igarashi et al., 2001).

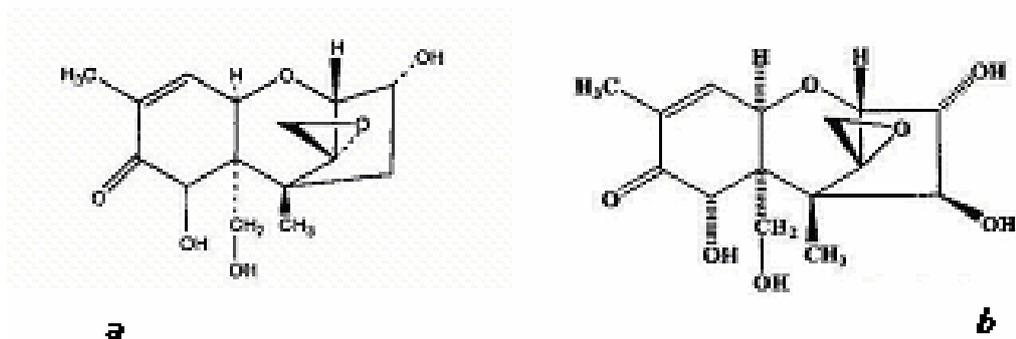
Tuttavia, gli studi compiuti sugli effetti immunomodulatori dello ZEA e dei suoi metaboliti sono alquanto esigui. In particolare, studi condotti su topi anziani hanno dimostrato che l' $\alpha$ -zearalanolo diminuisce la produzione di IFN $\gamma$  (Calamine et al., 2003), mentre, studi *in vitro* hanno evidenziato che lo ZEA determina una riduzione della proliferazione e della vitalità di linfociti bovini (Lioi et al., 2004).

Lo ZEA è un composto particolarmente stabile, in grado di resistere sia allo stoccaggio sia ai processi tecnologici cui è sottoposta la materia prima in corso di lavorazione in quanto non è degradato dalle temperature elevate.

### 1.3 Deossinivalenolo e Nivalenolo

Il deossinivalenolo (DON) e il nivalenolo (NIV) appartengono alla classe dei tricoteceni, che costituiscono il più vasto gruppo di fusariotossine comprendenti oltre centosettanta tossine e loro derivati (Mosse et al., 2004) prodotte da differenti specie di funghi, tra cui *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. moniliforme*, *F. poae*, *F. sporotrichioides* e *F. solani*). Su migliaia di campioni di cereali analizzati nell'Unione europea, l'incidenza di contaminazione è risultata pari al 57% per il DON e al 16% per il NIV (Schothorst et al., 2004).

Dal punto di vista chimico, i tricoteceni sono sesquiterpeni triciclici caratterizzati da un doppio legame tra il C9 e il C10 e con un anello epossido tra il C12 e il C13; per tale motivo vengono anche classificati come 12,13 -epossi-tricoteceni (Fig. 3).



**Figura 3.** Struttura del deossinivalenolo (a) e del nivalenolo (b).

I tricoteceni sono composti molto stabili in grado di resistere allo stoccaggio e a processi tecnologici quali macinatura e cottura, non essendo degradati dalle elevate temperature (Bretz et al., 2006; Hazel et al., 2004).

NIV e DON, analogamente ad altre micotossine, sono specie-specifici; il suino rappresenta la specie più sensibile, seguito da roditori, cane, gatto e specie avicole mentre i

ruminanti sono risultati più resistenti all'azione tossica di tali fusariotossine (Pestka et al., 2005b).

I tricoteceni sono potenti inibitori della sintesi proteica, in grado di interferire con la fase di inizio, allungamento o terminazione di tale processo, in quanto si legano alla subunità 60S dei ribosomi degli eucarioti; di conseguenza, gli effetti tossici si osservano soprattutto in quelle cellule e tessuti con elevato turn-over proteico come linfociti e fegato (Goyarts et al., 2006; Danicke et al., 2006).

Ai tricoteceni sono state attribuite diverse proprietà tossiche. Numerosi studi condotti su animali da esperimento hanno dimostrato che tali composti sono in grado di agire sul sistema immune alterando le risposte di ipersensibilità di tipo ritardato, la capacità fagocitaria (Pestka et al., 1994; Rotter et al., 1996), le risposte immuni dell'ospite verso le infezioni enteriche (Li et al., 2005). Studi *in vitro* hanno dimostrato che i tricoteceni possono sia sopprimere che stimolare le funzioni immuni (Bondy et al., 2000). Il NIV riduce la risposta anticorpale (Choi et al., 2000) e inibisce la proliferazione di linfociti stimolati con mitogeno (Forsell et al., 1985; Thuvander et al., 1999). Anche il DON è stato dimostrato inibire la proliferazione di linfociti umani e, inoltre, mostrare un effetto significativo sul profilo citochinico, in particolare è stato osservato un marcato aumento nella produzione di IL-2, un discreto aumento sia di IL-4 che di IFN $\gamma$  e un'inibizione di IL-6 (Thuvander et al., 1999). Altri studi hanno dimostrato che il DON è in grado di indurre la produzione di citochine, quali IL-2, IL-4 e IL-5 (Meky et al., 2001), e l'apoptosi (Pestka et al., 1994; Ouyang et al., 1996; Rocha et al., 2005). In particolare, Shifrin et al., (1999) hanno trovato che NIV e DON sono entrambi induttori dell'apoptosi in cellule Jurkat.

Recenti studi hanno dimostrato che il tricotecene DON e la tossina T-2 sono potenti inibitori della proliferazione *in vitro* delle cellule dendritiche umane (Steinman, 1991); essi sono anche in grado di ostacolare il processo di maturazione di tali cellule (Hymery et al., 2006). Nonostante la vasta diffusione di tali micotossine nei substrati alimentari, ancora molto esigui risultano, ad oggi, gli studi sulle interazioni tra differenti micotossine presenti come co-contaminanti nello stesso substrato (Speijers et al., 2004). Così, studi *in vitro*, hanno descritto le interazioni tra citrinina ed ocratossina in cellule renali (Heussner et al.,

2006); riguardo le fusariotossine, le co-contaminazioni possono esercitare effetti additivi o sinergici come dimostrato per vari tricoteceni (Tajima et al., 2002) ma possono anche agire da antagonisti (Koshinsky et al., 1992). Fino ad oggi, il numero di studi condotti al fine di valutare il potere immunotossico delle co-contaminazioni è davvero molto limitato. In uno studio *in vivo* sui ratti, Theumer et al., (2003) hanno dimostrato differenti effetti immunobiologici prodotti dalla miscela di fumonisina B1 e aflatossina B1 rispetto a quelli esercitati dalle singole micotossine, tuttavia i cambiamenti osservati non erano il risultato di una interazione additiva dei singoli effetti.

## **2 – MATERIALI E METODI**

### **2.1 Reagenti**

Il terreno di coltura RPMI 1640, la streptomina, la penicillina, la L-glutamina, il siero fetale bovino (FBS) e gli aminoacidi non essenziali (NEAA) sono stati forniti dalla Cambrex Bioproducts Europe (Verviers, Belgium). L'actinomicina D (A 9415), la concanavalina A (C 0412) e i reagenti per il dosaggio della latticodeidrogenasi (LDH) erano prodotti dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Il substrato della caspasi 3, l'acetil Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-metilcoumarin (Ac-DEVD-AMC), e lo standard della caspasi 3, 7-amino-4-metilcoumarin (AMC), erano forniti dalla Calbiochem (San Diego, CA, USA). Il Trizol e tutti gli altri reagenti usati nella estrazione e purificazione dell'RNA, nella reazione di trascrizione inversa, nella reazione polimerasica a catena (PCR) e nell'elettroforesi sono stati acquistati dalla Invitrogen Ltd (Paisley, UK).

### **2.2 Micotossine**

Le micotossine sono state acquistate dalla Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). La fumonisina B1 (F-1147) è stata solubilizzata in PBS, l'alpha-zearalenolo (Z-0166), il nivalenolo (N-7769) in metanolo, il deossinivalenolo (D-0156) in etanolo, tutte sono state poi ulteriormente diluite in terreno completo alle opportune concentrazioni. Per

verificare un eventuale effetto citotossico da parte del metanolo e dell'etanolo, sono stati condotti esperimenti preliminari su cellule incubate con entrambi gli alcoli.

### **2.3 1° SISTEMA CELLULARE: cellule T Jurkat**

Le cellule Jurkat sono linfociti T, CD4+ trasformati, ampiamente utilizzate come modello di cellula T, in quanto esprimono il recettore delle cellule T, CD3, e numerosi altri recettori di membrana che caratterizzano i linfociti T maturi (Jenkins et al., 2001). In particolare, tale modello è apparso estremamente utile per la caratterizzazione della risposta alla citochina IL-2 e per lo studio della struttura del recettore antigenico, come pure per l'analisi dei meccanismi di trasduzione del segnale. Infatti tali cellule, pur essendo trasformate, sono in grado, opportunamente stimolate, di produrre la citochina IL-2 in un modo paragonabile alle cellule T del sangue periferico e di esibire un ciclo cellulare del tutto simile ai linfociti attivati (Jenkins et al., 2001).

#### **2.3a Coltura cellulare**

Cellule T Jurkat (ATCC, Manassas, VA) sono state coltivate in RPMI 1640 supplementato con siero fetale bovino (FBS), inattivato al calore, al 10% (v/v), L-glutammina 2 mM, penicillina 100 unità/ml, streptomina 100 µg/ml, e aminoacidi non essenziali (NEAA) 1% (w/v). Il terreno di coltura è stato rinnovato ogni 2-3 giorni, in tal modo le cellule erano mantenute nella fase esponenziale di crescita, in incubatore a 37 °C con atmosfera umidificata contenente 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.3b Test di proliferazione cellulare**

Cellule Jurkat, seminate ad una densità di  $2 \times 10^4$ /pozzetto in piastre a fondo piatto da 96 pozzetti, sono state incubate per 24 h in presenza delle quattro micotossine a concentrazioni crescenti: FB1(20-150 µM),  $\alpha$ -ZEA (10-80 µM) NIV e DON (0.062 – 8 µM ). I range di concentrazioni delle micotossine sono stati scelti sulla base di

esperimenti dose-risposta preliminari, condotti al fine di individuare i tempi e le concentrazioni ottimali, nonché su dati presenti in letteratura, (Creppy et al., 2002; Kouadio et al., 2005, Abid-Essefi et al., 2004). Nelle ultime 16 ore di incubazione, è stata aggiunta la [<sup>3</sup>H]-timidina (1μCi/pozzetto), dopodiché le cellule sono state trasferite su filtri, montati in micropiastre, usando un raccogliatore cellulare semiautomatico (Filtermate, Packard, Danvers, MA). In seguito all'aggiunta del liquido di scintillazione, è stata misurata l'incorporazione della timidina triziata, mediante il β-counter (Top Count NXT™, Packard, Danvers, MA), e i risultati espressi come cpm (conta per minuto).

### **2.3c Misurazione dell'apoptosi**

L'attività della caspasi 3, quale esecutore finale del processo apoptotico, è stata determinata misurando il rilascio del 7-amino-4-metilcoumarin (AMC), in seguito all'idrolisi dell'acetil Asp-Glu-Val-Asp 7-amido-4-metilcoumarin (Ac-DEVD-AMC), da parte dell'enzima stesso. Le cellule, (6x10<sup>5</sup>/pozzetto) in piastre da 48 pozzetti, sono state incubate con differenti concentrazioni di α-ZEA, NIV e DON. Dopo 24 h, sono state raccolte e centrifugate a 3500 g per 10 minuti, successivamente il pellet, dopo un lavaggio con PBS, è stato risospeso in 100 μl di buffer di lisi (50 mM HEPES, pH 7.4, 5 mM CHAPS, 5 mM DTT) e tenuto a 4°C per 20 min. I lisati sono stati poi centrifugati (10,000g, per 5 min a 4 °C) e il surnatante incubato con il buffer di reazione (buffer di lisi addizionato con EDTA 2 mM e Ac-DEVD-AMC 50 μM) per 60 min a 37 °C. Infine, è stata misurata l'emissione di fluorescenza (360<sub>EX</sub>/460<sub>EM</sub>) per calcolare la concentrazione di AMC rilasciato, utilizzando la curva di calibrazione ottenuta con lo standard. L'attività della caspasi 3 viene quindi espressa come nmoli di AMC/mg proteina/ora. Il controllo positivo è rappresentato da cellule trattate con actinomicina D (10 μM).

### **2.3d Test di citotossicità**

Il rilascio dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH) nel terreno di coltura viene utilizzato come marker della tossicità cellulare *in vitro* (Tipton et al., 2003). Le cellule,

( $4 \times 10^5$ /pozzetto) in piastre da 48 pozzetti, sono state incubate con concentrazioni crescenti di  $\alpha$ -ZEA, NIV e DON. Dopo 24 ore, sono state raccolte e centrifugate a 4000 g per 5 min a 4°C; è stato recuperato il surnatante mentre, il pellet, dopo un lavaggio con TBS, è stato risospeso in 100  $\mu$ l di buffer di lisi (Tris-HCl 0.2 M pH 8.0 e Triton X-100 1%) ed incubato per 30 min a 4°C. Dopo la centrifugazione (13000 g per 10 min a 4°C), i lisati (100  $\mu$ l) e i supernatanti (100  $\mu$ l) sono stati incubati, per 30 min a 37°C, con 100  $\mu$ l di buffer di reazione (0.7 mM p-iodonitrotetrazolium Violet, 50 mM L-lactic acid, 0.3 mM phenazine methosulphate, 0.4 mM NAD e 0.2 M Tris-HCl pH 8.0).

L'assorbanza è stata misurata spettrofotometricamente a 490 nm e i risultati sono espressi come percentuale del LDH totale rilasciato dal controllo positivo costituito da cellule trattate 25  $\mu$ l di Nonidet P-40 (NP-40) al 10% e calcolata con la formula seguente:  $(\text{valore abs surn.} - \text{valore abs bianco}) / (\text{abs surn.} + \text{abs lis.}) \times 100$ .

### **2.3e Dosaggio mRNA di specifiche citochine**

I livelli di espressione degli mRNA di alcune citochine nelle cellule Jurkat sono stati determinati mediante tecnica semi-quantitativa di trascrizione inversa e reazione polimerasica a catena (RT-PCR). Le cellule sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti ( $2 \times 10^6$ /pozzetto) e incubate, per 24 h, con concentrazioni crescenti delle quattro micotossine, sia singolarmente che in combinazione, in presenza/assenza di PMA (1  $\mu$ g/l) e ionomicina (0.5  $\mu$ M) (Luongo et al., 2003).

Al termine del periodo di incubazione, l'RNA totale è stato isolato dalle cellule usando il reagente TRIZOL secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice. La reazione di trascrizione inversa di 1  $\mu$ g di RNA è stata realizzata utilizzando oligo-dT<sub>12-18</sub> come primers e differenti aliquote di cDNA sono state quindi amplificate con la PCR utilizzando 1 U di TAQ DNA polimerasi e 20 pmol di ciascun primer. Il programma di termo-amplificazione comprendeva una denaturazione iniziale (5 min a 94 °C), seguita da 28-35 cicli, ciascuno dei quali comprendente una fase di denaturazione (1 min a 94 °C), una fase di *annealing* di 1 min a 60 °C (IL-8), a 54 °C (L-32) e 52 °C (IL-2 e IFN- $\gamma$ ), una fase di elongazione (30 sec a 72 °C) ed una fase finale di estensione di 5 min a 72 °C.

Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione e la dimensione dei prodotti di PCR sono riportati nella **tabella 1**. I primers sono stati caratterizzati nel nostro laboratorio usando il software Lasergene Primerselect (DNASTAR Inc, Madison, Wisconsin, USA) cosicché frammenti di cDNA amplificati potessero essere facilmente distinti da DNA genomico, eventualmente presente. Infine i prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% (w/v) colorato con VISTRA green (Amersham International plc, Buckinghamshire, UK); le bande fluorescenti ottenute sono state quindi sottoposte ad analisi densitometrica utilizzando il software IMAGEQUANT (Molecular Dynamics, Inc, Sunnyvale, CA).

Il gene della proteina costitutiva L-32 è stato utilizzato come riferimento (Hamalainen et al., 2001) e i risultati sono stati espressi come rapporto tra mRNA citochina/L-32.

L-32	<b>Sense</b>	5'-CCT CAG ACC CCT TGT GAA GC-3'	145 bp
	<b>Anti-sense</b>	5'-GCC CTT GAA TCT TCT ACG AAC C-3'	
IL-2	<b>Sense</b>	5'-AAC TCA CCA GGA TGC TCA CAT TTA-3'	148 bp
	<b>Anti-sense</b>	5'-TTC CTG GGT CTT AAG TGA AAG TTT-3'	
IFN $\gamma$	<b>Sense</b>	5'-TCA GCT CTG CAT CGT TTT GG-3'	120 bp
	<b>Anti-sense</b>	5'-GTT CCA TTA TCC GCT ACA TCT GAA-3'	
IL-8	<b>Sense</b>	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3'	289 bp
	<b>Anti-sense</b>	5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3'	

**Tabella 1.** Sequenza dei primer

### 2.3f Analisi statistica

I risultati del test di proliferazione, dell'attività della caspasi 3 e del rilascio di LDH sono espressi come medie  $\pm$  DS di esperimenti indipendenti. Per analizzare le differenze tra cellule trattate e non trattate con le micotossine è stato utilizzato il *t-test* di Student. Inoltre, le differenze tra i vari gruppi trattati sono state determinate con l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) e le comparazioni multiple delle medie dei trattati sono

state effettuate mediante il Tukey test. La significatività è stata attribuita a partire da valori di  $P < 0.05$ .

## **2.4 2° SISTEMA CELLULARE: linfociti di suino**

Come secondo sistema cellulare, sono stati utilizzati linfociti di suino in coltura primaria, allestita con cellule provenienti da sangue intero.

La scelta di utilizzare i linfociti da sangue intero piuttosto che isolati mediante gradiente, è stata dettata dalla considerazione che tale metodica ha il vantaggio di essere meno dispendiosa sia come costi che come tempi rispetto a quella dei linfociti isolati. Inoltre, la coltura da sangue intero rappresenta un modello *in vitro* che può meglio approssimare gli eventi che accadono *in vivo* (Stalder et al., 2005), in particolare le interazioni tra le diverse popolazioni cellulari, da cui deriva la capacità di elaborare e secernere le citochine nella risposta finale (Yancy et al., 2001). E' stato adottato un modello di cellule di suino in considerazione della particolare sensibilità di tale specie verso le fusariotossine, oggetto del presente studio.

### **2.4a Animali**

Come donatori di sangue sono stati utilizzati 26 suini, razza Landrace norvegese, clinicamente sani, di età compresa tra i 3 e i 5 mesi. I campioni di sangue per il test della proliferazione linfocitaria sono stati prelevati dalla *vena cava cranialis* in tubi Vacutainer contenenti 7 ml di eparina 150 IU.

### **2.4b Test di proliferazione linfocitaria**

I campioni di sangue sono stati diluiti 1: 20 con RPMI 1640 contenente L-glutammina (2mM), penicillina (100 unità/ml), streptomina (100 µg/ml), aminoacidi non essenziali (NEAA) 1% (w/v), 2-mercaptoetanolo  $5 \times 10^{-5}$  M e siero autologo inattivato al calore (2% v/v). Innanzitutto stati eseguiti degli esperimenti preliminari al fine di

individuare la concentrazione ottimale di Concanavalina A (Con A) da utilizzare come mitogeno. Nelle piastre da 96 pozzetti a fondo piatto, sono stati dispensati 100  $\mu$ l di sangue diluito e 100  $\mu$ l di terreno di coltura stimolato con concentrazioni crescenti di Con A o con solo mezzo, in triplicato. Una volta individuata la concentrazione ottimale del mitogeno, si è proceduto con l'esperimento vero e proprio dispensando 100 $\mu$ l di sangue diluito stimolato con Con A (10  $\mu$ g/ml) e 100  $\mu$ l di terreno contenente concentrazioni crescenti delle quattro micotossine, sia singolarmente che in combinazione. Il controllo negativo è costituito da sangue intero non stimolato e il controllo positivo da sangue stimolato e non incubato con le micotossine. Le colture cellulari vengono cresciute a 37° C per 72h in atmosfera umidificata contenente CO<sub>2</sub> al 5%, e nelle ultime 16 ore viene aggiunta la [<sup>3</sup>H]- timidina (20  $\mu$ l/pozzetto), quale marker della sintesi di DNA (vedi paragrafo 2.3b).

#### **2.4c Analisi statistica**

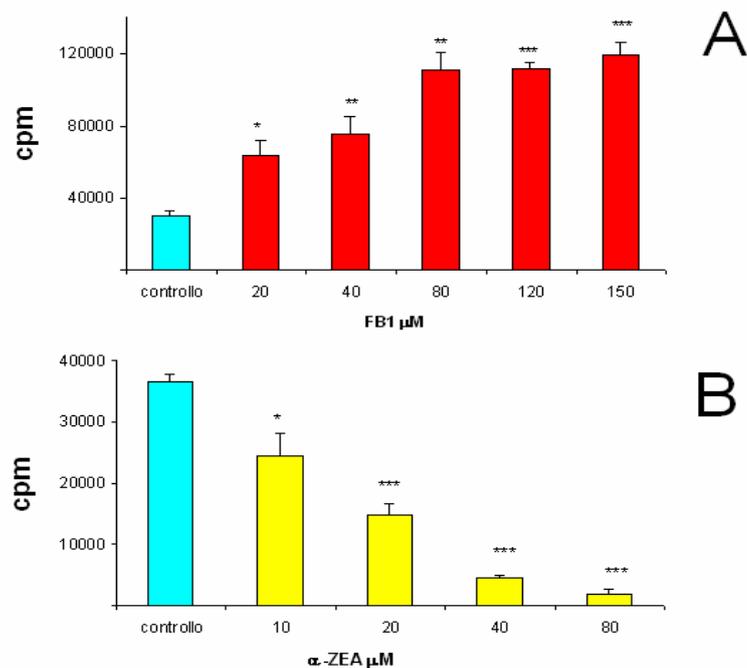
Per analizzare le differenze tra cellule trattate e non trattate con le micotossine è stato utilizzato il *t-test* di Student; la significatività statistica è stata raggiunta per valori di  $P < 0,05$ .

### 3 – RISULTATI – Cellule Jurkat

#### 3.1 Influenza di FB1 e $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione.

Per individuare le condizioni ottimali di risposta a diversi tempi, sono stati condotti esperimenti preliminari a 24, 48 e 72h; il tempo di 24h è risultato essere il periodo di incubazione ottimale delle micotossine esaminate.

Il trattamento di cellule Jurkat con concentrazioni crescenti di FB1 (da 20 a 150  $\mu$ M) (Fig. 4A) mostra un aumento della proliferazione che raggiunge un plateau a 80 $\mu$ M. Al contrario, quando le cellule sono incubate con concentrazioni crescenti di  $\alpha$ -ZEA, (da 20 a 80  $\mu$ M) (Fig. 4B), si evidenzia un marcato effetto inibitorio sulla proliferazione, tale effetto risulta essere significativo e dose-dipendente già alle basse concentrazioni.

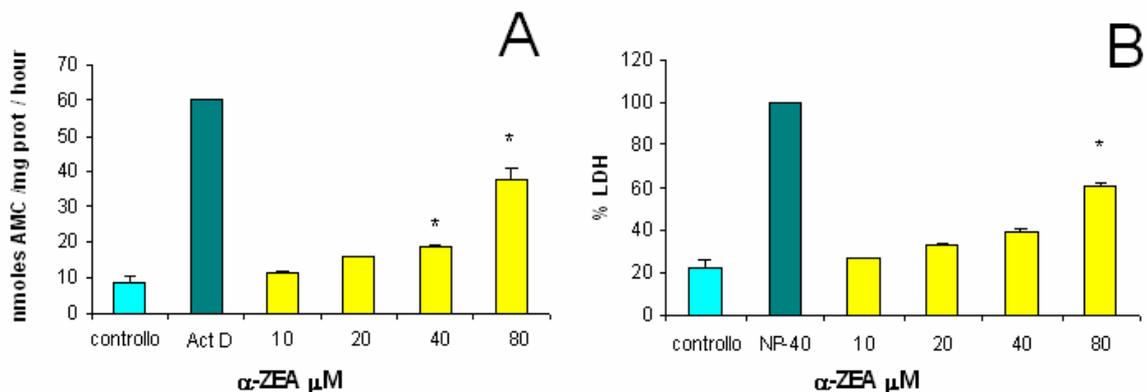


**Figura 4.** Effetti di FB1 e  $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione di cellule Jurkat dopo 24 ore di incubazione. Cellule Jurkat ( $2 \times 10^4$ /pozzetto) sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti in presenza di concentrazioni crescenti di FB1 (A) e di  $\alpha$ -ZEA (B) per 24h. La sintesi di DNA è stata misurata mediante incorporazione di [ $^3$ H]-timidina ed espressa in conte per minuto (cpm). Ogni valore rappresenta la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \* =  $P < 0.05$ ; \*\* =  $P < 0.01$ ; \*\*\* =  $P < 0.001$  vs controllo.

### 3.2 Effetto di $\alpha$ -ZEA sulla vitalità cellulare.

Al fine di indagare sul meccanismo che sottende l'effetto inibitorio esercitato dalla micotossina  $\alpha$ -ZEA, è stata determinata l'attività della caspasi 3, quale esecutore finale del processo apoptotico. I risultati ottenuti mostrano che l'esposizione delle cellule a differenti concentrazioni della micotossina induce un aumento dell'attività dell'enzima rispetto ai controlli non trattati (Fig. 5A).

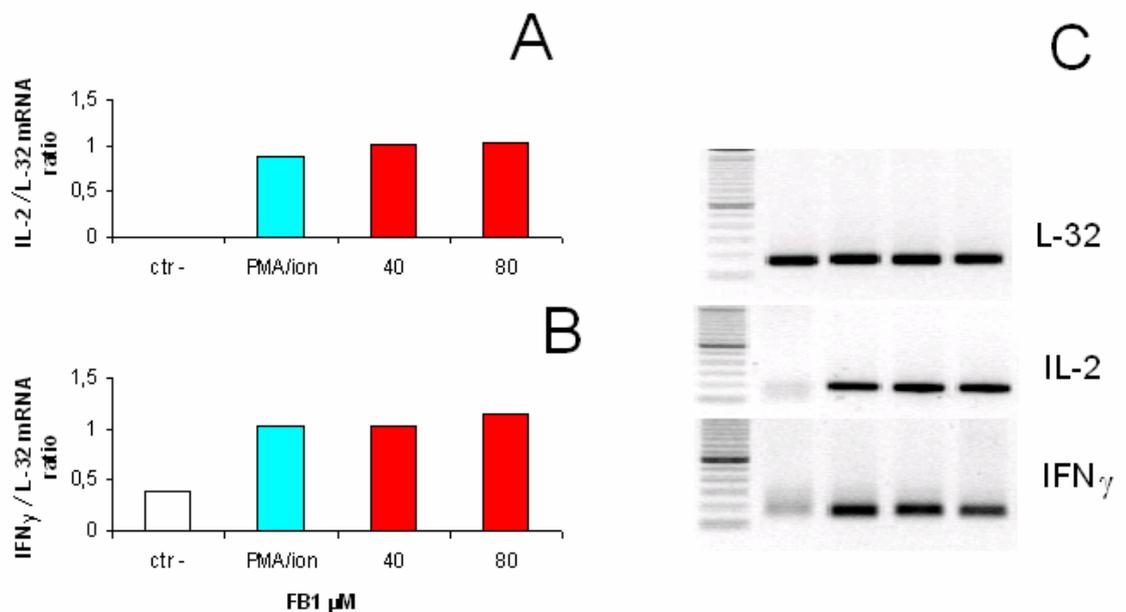
Inoltre, l'effetto di  $\alpha$ -ZEA è stato valutato anche sulla integrità e vitalità cellulare mediante il dosaggio del rilascio della lattico deidrogenasi (LDH) nel terreno di coltura. I risultati mostrano che il trattamento con concentrazioni crescenti non determina un aumento significativo, rispetto al controllo, dell'attività di tale enzima. E' da notare che solo alla più alta concentrazione di  $\alpha$ -ZEA (80 $\mu$ M), tale aumento diventa statisticamente significativo. Questi risultati, pertanto, suggeriscono che l'inibizione della proliferazione indotta da  $\alpha$ -ZEA è mediata essenzialmente dall'apoptosi e che la necrosi è un fenomeno secondario che si verifica solo in presenza di alte concentrazioni.



**Figura 5.** Effetto di  $\alpha$ -ZEA sulla vitalità cellulare. Cellule Jurkat ( $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto) sono state coltivate in piastre da 48 pozzetti ed incubate in terreno completo con  $\alpha$ -ZEA (0-80  $\mu$ M) per 24h. (A) L'induzione dell'apoptosi è stata determinata mediante l'attività della caspasi 3 e i valori ottenuti sono stati espressi come nanomoli di AMC/mg di proteina/ora. I risultati rappresentano la media  $\pm$  SD di valori in triplicato da tre esperimenti indipendenti. Le cellule trattate con 10  $\mu$ M di actinomicina D rappresentano il controllo positivo. (B) La citotossicità della micotossina è stata valutata mediante analisi dell'attività della LDH rilasciata nel terreno di coltura. I dati sono espressi come percentuale rispetto all'LDH rilasciato dal controllo positivo costituito da cellule Jurkat trattate con NP-40 (25  $\mu$ l). \* $P < 0.05$  vs controllo.

### 3.3 Effetto di FB1 e $\alpha$ -ZEA sulla espressione degli mRNA di citochine.

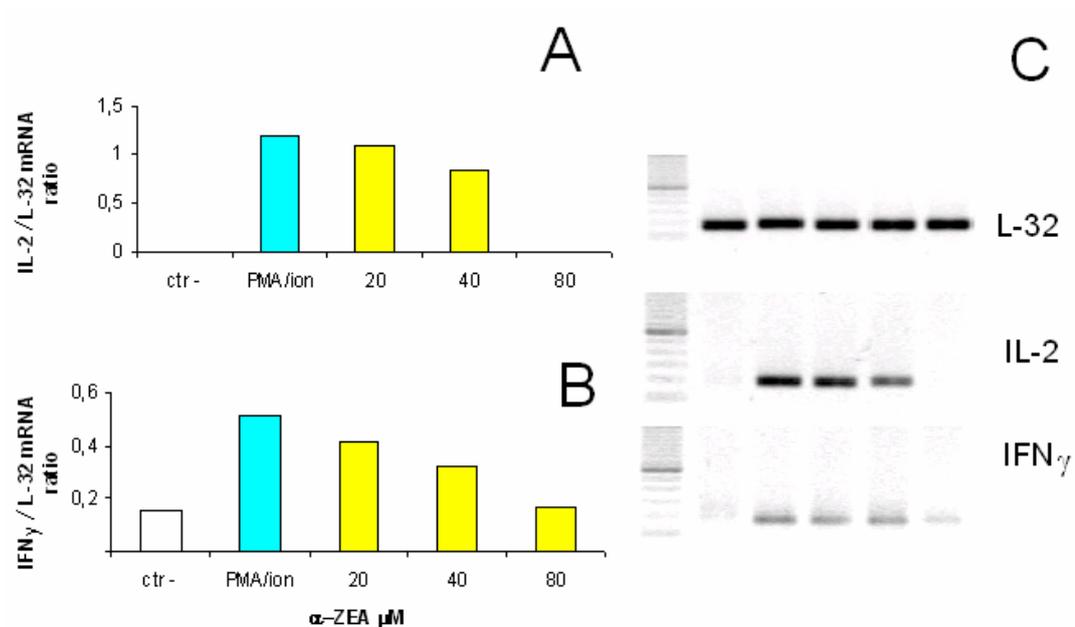
La capacità immunomodulatoria delle micotossine in esame è stata oggetto di ulteriori indagini, attraverso l'analisi dei livelli di espressione di specifiche citochine. In particolare, sono stati valutati gli mRNA di IL-2, e di IFN $\gamma$ , quali markers di funzionalità linfocitaria, mediante analisi semi-quantitativa RT-PCR, dopo normalizzazione al corrispondente contenuto in mRNA del gene controllo, L-32 (Fig. 6).



**Figura 6.** Effetti di FB1 sull'espressione degli mRNA delle citochine. Cellule Jurkat, stimulate con PMA e ionomicina, sono state incubate con concentrazioni crescenti di FB1 per 24h. I livelli di mRNA di IL-2 (A), IFN $\gamma$  (B) e della proteina costitutiva L-32 sono stati valutati mediante analisi semi-quantitativa RT-PCR. Gli amplificati sono stati analizzati su gel d'agarosio al 2% (C). Dopo l'elettroforesi è stata eseguita un'analisi densitometrica e i risultati espressi come rapporto mRNA citochine/L32. I risultati rappresentano uno di tre esperimenti indipendenti. Il controllo negativo (ctr -) è costituito da cellule non stimulate.

L'espressione delle citochine, come atteso, viene misurata solo nelle cellule stimulate con PMA e ionomicina, mentre i trascritti della L-32 sono simili sia nelle cellule stimulate che non stimulate. Il trattamento delle cellule con concentrazioni crescenti di FB1 non evidenzia alcun effetto significativo sui livelli di espressione delle citochine esaminate.

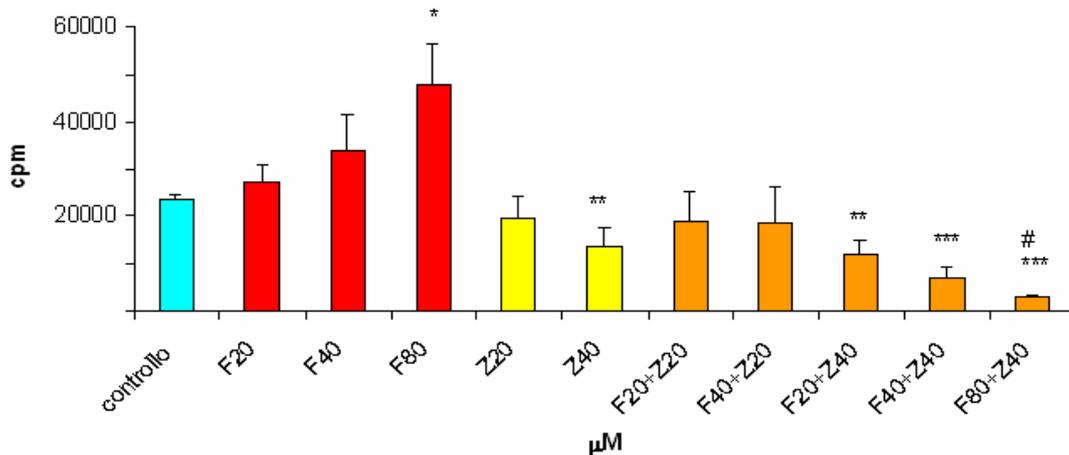
Al contrario, nelle cellule esposte a concentrazioni crescenti di  $\alpha$ -ZEA, si assiste ad una riduzione dei livelli di trascritto per entrambe le citochine, e tale riduzione sembra essere dose-dipendente (Fig. 7).



**Figura 7.** Effetti di  $\alpha$ -ZEA sull'espressione degli mRNA delle citochine. Cellule Jurkat, stimulate con PMA e ionomicina, sono state incubate con concentrazioni crescenti di FB1 e  $\alpha$ -ZEA per 24h. I livelli di mRNA di IL-2, (A) IFN $\gamma$  (B) e della proteina costitutiva L-32 sono stati valutati mediante analisi semi-quantitativa RT-PCR. Gli amplificati sono stati analizzati su gel d'agarosio al 2 % (C). Dopo l'elettroforesi è stata eseguita un'analisi densitometrica e i risultati espressi come rapporto mRNA citochine/L32. I risultati rappresentano uno di tre esperimenti indipendenti. Il controllo negativo (ctr -) è costituito da cellule non stimulate.

### 3.4 Influenza della co-incubazione FB1 + $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione.

Nelle cellule esposte alle due micotossine, variamente combinate tra loro così come illustrato nella fig. 5, gli effetti sulla proliferazione hanno dato i seguenti risultati. Nella co-incubazione, l'inibizione indotta da  $\alpha$ -ZEA prevale sull'effetto stimolatorio indotto dalla incubazione con la sola FB1. Inoltre, appare evidente come la più alta concentrazione di FB1 (80  $\mu$ M) associata alla concentrazione più elevata di  $\alpha$ -ZEA (40  $\mu$ M) induce una inibizione della proliferazione maggiore e statisticamente significativa rispetto a quella indotta dalla concentrazione più elevata dell' $\alpha$ -ZEA incubata da sola. Quindi la FB1 non solo non riesce a revertire l'effetto inibitorio di  $\alpha$ -ZEA ma anzi, aumentandone le concentrazioni, ne potenzia l'attività.

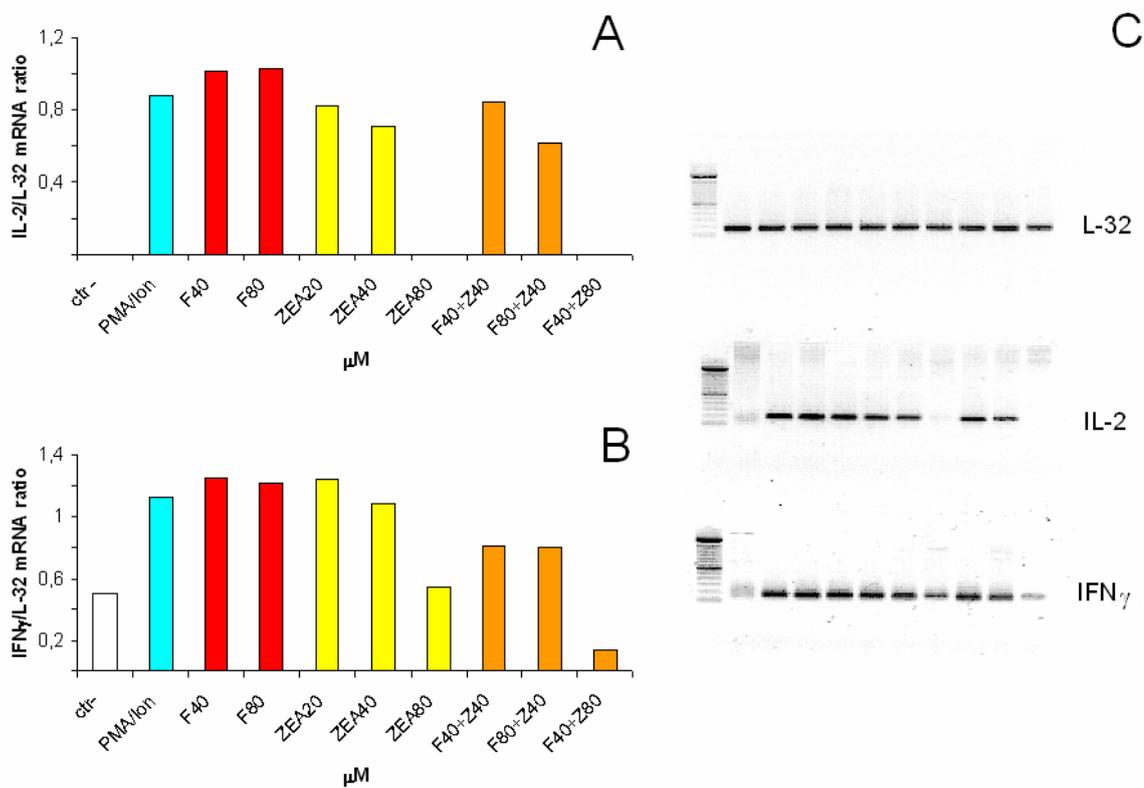


**Figura 8.** Effetti della co-incubazione di FB1 e  $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione di cellule Jurkat. Le cellule sono state trattate con differenti concentrazioni delle due micotossine sia singolarmente, che in combinazione per 24h. I risultati riportati in grafico sono espressi come conte per minuto (cpm) e riportati come media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. \*  $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$  vs controllo. # indica una differenza significativa tra l'inibizione riscontrata incubando le cellule con la miscela FB1+ $\alpha$ -ZEA (80:40  $\mu$ M) e quella osservata incubando le cellule con la sola  $\alpha$ -ZEA 40 $\mu$ M.

Per definire il tipo di interazione è stato calcolato il “combination index” che è dato dal rapporto tra l'effetto prodotto dalla sostanza in combinazione e quello prodotto dalla sostanza da sola. Quando tale rapporto risulta minore di 1, ed è il caso di FB1+ $\alpha$ -ZEA, allora l'interazione si definisce di tipo sinergico. Se invece il rapporto è uguale o maggiore di 1, allora l'interazione è, rispettivamente, di tipo additivo o antagonista.

### 3.5 Influenza della co-incubazione FB1 + $\alpha$ -ZEA sulla espressione di citochine.

I risultati ottenuti confermano quelli riportati in seguito all'esposizione delle cellule alle singole micotossine. E' interessante notare che l'inibizione indotta da  $\alpha$ -ZEA sui livelli delle due citochine viene confermata anche in presenza di crescenti concentrazioni di FB1, in particolare è da sottolineare che i livelli di IFN $\gamma$  si riducono ulteriormente in presenza della miscela (80  $\mu$ M  $\alpha$ -ZEA + 40  $\mu$ M FB1) rispetto a quelli osservati in presenza della sola  $\alpha$ -ZEA 40  $\mu$ M (Fig. 6).



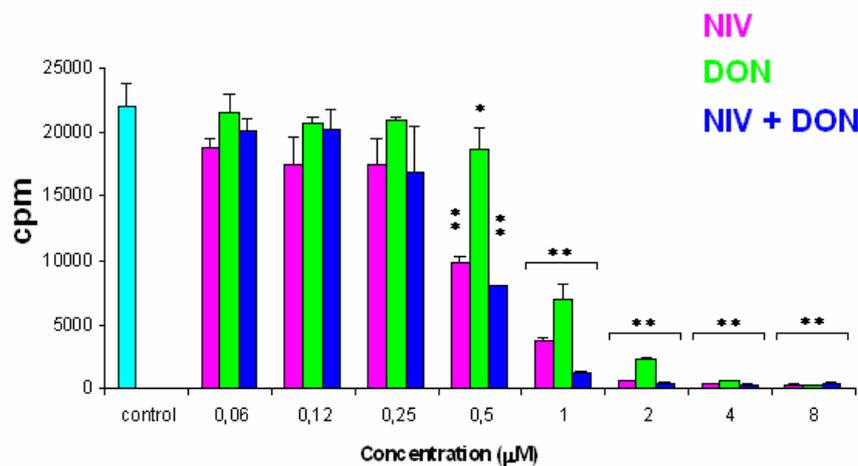
**Figura 9.** Effetti della co-incubazione di FB1 +  $\alpha$ -ZEA sull'espressione degli mRNA di IL-2 e IFN $\gamma$ . Cellule Jurkat, stimulate con PMA e ionomicina, sono state incubate con concentrazioni crescenti di FB1 (40-80  $\mu$ M) e  $\alpha$ -ZEA (20-40-80  $\mu$ M) per 24h. I livelli di mRNA di IL-2, (A) IFN $\gamma$  (B) e della proteina costitutiva L-32 sono stati valutati mediante analisi semi-quantitativa RT-PCR. Gli amplificati sono stati analizzati su gel d'agarosio al 2%, (C). Dopo l'elettroforesi è stata eseguita un'analisi densitometrica e i risultati espressi come rapporto mRNA citochine/L32. I risultati riportati rappresentano uno di tre esperimenti indipendenti. Il controllo negativo (ctr -) è costituito da cellule non stimulate.

### 3.6 Effetto di NIV e DON sulla proliferazione cellulare.

Nella figura 10 sono riportati i risultati relativi all'analisi proliferativa condotta su cellule Jurkat incubate con concentrazioni crescenti di NIV e DON, da sole ed in combinazione, in un range compreso tra 0,0625 e 8  $\mu\text{M}$ . Studi preliminari, compiuti a differenti tempi, hanno indicato 24h, come tempo ottimale di incubazione per entrambe le micotossine (dati non mostrati).

I risultati illustrati in figura 10 mostrano che il DON ha un effetto inibitorio sulla proliferazione delle cellule; tale effetto diventa statisticamente significativo a partire dalla concentrazione 1 $\mu\text{M}$  ed è di tipo dose-dipendente. Anche il NIV esplica una forte azione inibitoria sulla proliferazione che diventa significativa già a 0,5  $\mu\text{M}$ , suggerendo una maggiore tossicità di tale micotossina rispetto al DON. Gli effetti inibitori osservati non sono influenzati dai solventi utilizzati per solubilizzare le micotossine. Esperimenti condotti su cellule incubate con concentrazioni differenti dei due solventi, infatti, non hanno rivelato alcun effetto inibitorio (dati non mostrati).

La co-incubazione causa un'ulteriore riduzione dose-dipendente della proliferazione cellulare lasciando ipotizzare un effetto di tipo additivo.

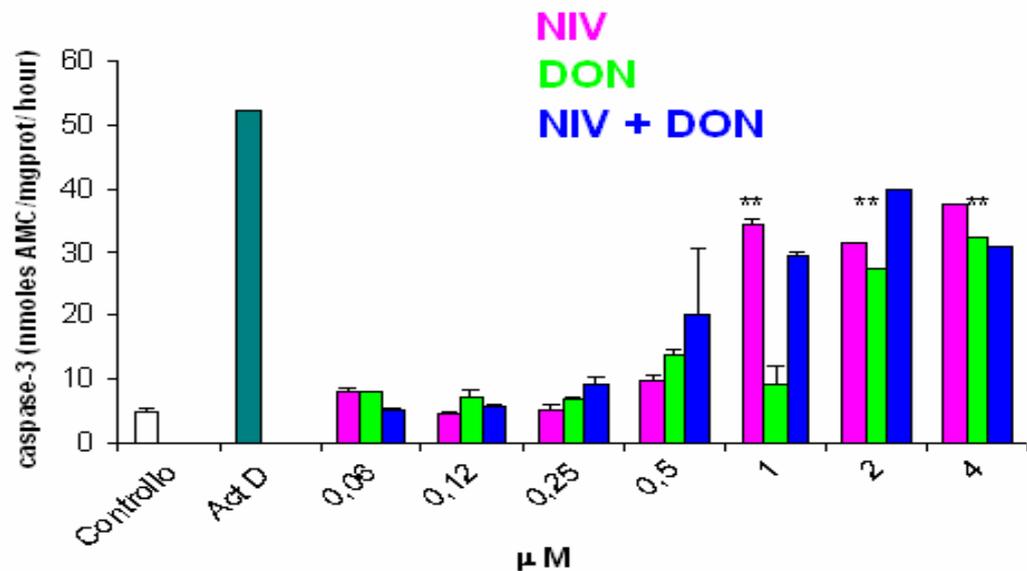


**Figura 10.** Effetti di NIV e DON sulla proliferazione di cellule Jurkat. Cellule Jurkat ( $2 \times 10^4$  cellule/ml) sono state coltivate in piastre da 96 pozzetti per 24h in presenza delle due micotossine, sia singolarmente che in combinazione, a concentrazioni crescenti comprese in un range tra 0,0625 e 8  $\mu\text{M}$ . La sintesi del DNA è stata misurata valutando l'incorporazione della [ $^3\text{H}$ ]-timidina ed i risultati ottenuti espressi come conte per minuto (cpm). Ciascun valore rappresenta la media  $\pm$  SD di tre esperimenti separati. Il controllo è rappresentato da cellule Jurkat non trattate con le micotossine.

### 3.7 Effetto di NIV e DON sulla vitalità cellulare.

Per verificare se l'inibizione della proliferazione cellulare indotta dalle micotossine, NIV e DON, fosse associata o meno all'induzione di apoptosi cellulare, è stata valutata l'attività della caspasi 3, effetto finale del processo apoptotico,

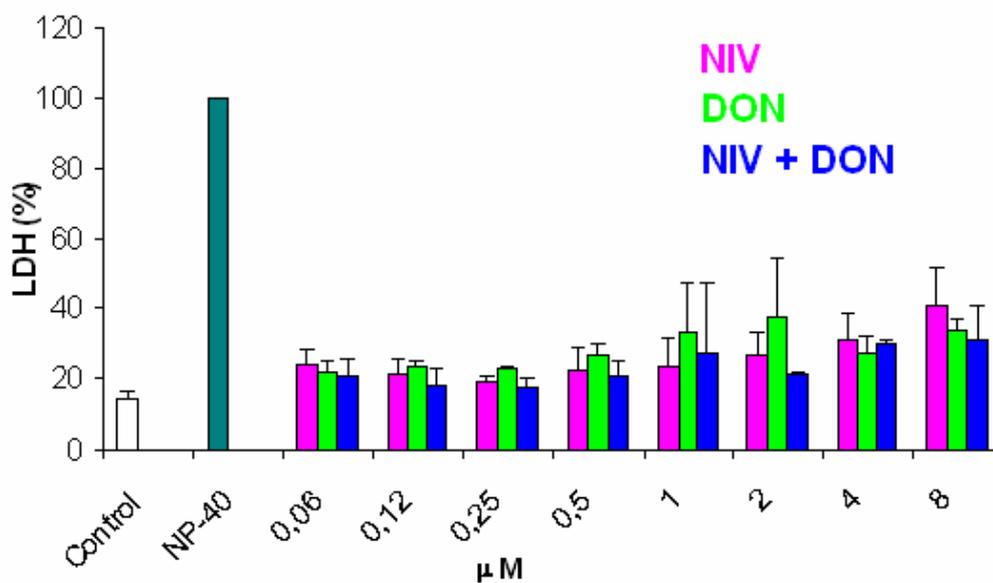
Nella figura 11, sono riportati i risultati ottenuti nelle cellule incubate con DON e NIV, singolarmente e in combinazione. L'esposizione delle cellule a concentrazioni crescenti delle due micotossine risulta in un aumento dell'attività della caspasi 3, rispetto al controllo costituito da cellule non trattate. Non è stato possibile valutare l'attività enzimatica alla concentrazione di 8  $\mu\text{M}$  a causa della esigua quantità di cellule sopravvissute a tale concentrazione.



**Figura 11.** Valutazione dell'attività della caspasi 3 in cellule Jurkat trattate con NIV e DON. Cellule Jurkat ( $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto) sono state coltivate in piastre da 48 pozzetti per 24h in presenza di concentrazioni crescenti (da 0,0625 a 8  $\mu\text{M}$ ) delle due micotossine, sia singolarmente che in combinazione. L'induzione dell'apoptosi è stata valutata mediante il dosaggio dell'attività della caspasi 3 e i valori ottenuti sono stati espressi come nanomoli di AMC/mg di proteina/ora. I risultati rappresentano la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti. Le cellule trattate con 10  $\mu\text{M}$  di actinomicina D rappresentano il controllo positivo. \*\*P < 0.05 vs controllo.

L'effetto delle due micotossine in esame è stato, inoltre, valutato anche sull'integrità e sulla vitalità cellulare, attraverso il dosaggio dell'enzima lattico deidrogenasi (LDH) rilasciato nel terreno di coltura dalle cellule danneggiate.

Nella figura 12 è riportato il dosaggio dell'LDH rilasciato nel mezzo dalle cellule incubate con le due micotossine da sole ed in combinazione. Dalla figura si evince che le micotossine determinano un lieve aumento dell'enzima senza, però, raggiungere differenze statisticamente significative rispetto al controllo. I risultati indicano che l'inibizione della proliferazione cellulare è mediata essenzialmente dall'induzione dell'apoptosi, mentre la necrosi non si verifica nemmeno in seguito all'esposizione delle cellule alle concentrazioni più elevate.



**Figura 12.** Dosaggio dell'LDH rilasciato da cellule Jurkat incubate con NIV e DON. Cellule Jurkat ( $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto) sono state coltivate in piastre da 48 pozzetti per 24h ed incubate in presenza delle due micotossine, singolarmente e in combinazione, a concentrazioni crescenti comprese in un range tra 0,0625 e 8  $\mu$ M. La citotossicità delle micotossine è stata valutata determinando l'attività di LDH rilasciato nel mezzo dalle cellule esposte alle micotossine. I dati sono espressi come percentuale rispetto all'LDH rilasciato da un controllo positivo costituito da cellule Jurkat trattate con 1% di NP-40 che provoca la lisi cellulare, ottenendo così il 100% di attività dell'LDH.

### 3.8 Effetto di NIV e DON sulla espressione di citochine.

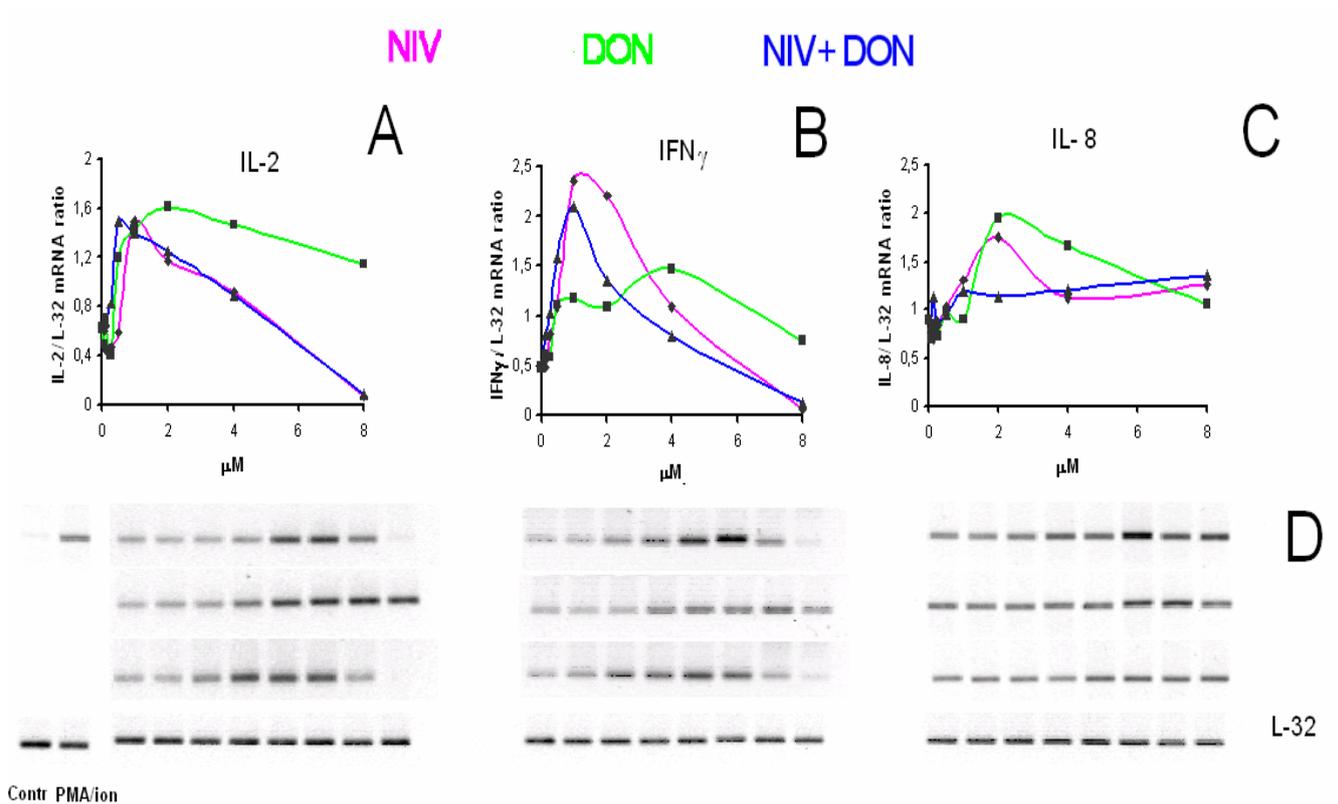
Per le micotossine NIV e DON è stata valutata, oltre all'espressione di IL-2 e IFN $\gamma$ , anche l'espressione di IL-8. Cellule Jurkat, stimulate con PMA/ionomicina, sono state incubate con concentrazioni crescenti delle due fusariotossine in un range che va da 0.0625 a 8  $\mu$ M.

In presenza di NIV (Fig.13) i livelli di mRNA relativi a IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-8 aumentano progressivamente e raggiungono il picco massimo a 1-2  $\mu$ M, mentre concentrazioni più alte sono apparse meno stimolanti (4  $\mu$ M) o inibitorie (8  $\mu$ M) per le citochine di tipo Th-1 esaminate; al contrario la IL-8 è stata indotta in tutto il range di concentrazione. Allo stesso modo, DON induce l'espressione dei trascritti di IL-8 e di IFN $\gamma$ ; tuttavia quest'ultimo raggiunge il picco più tardi e con un incremento più basso di quello riportato per NIV (Fig.13). E' da notare come questa micotossina sia in grado di influenzare in maniera del tutto singolare i livelli di espressione di IL-2; infatti all'aumentare della concentrazione di DON corrisponde un aumento costante dei trascritti di IL-2, con nessuna evidente relazione dose-effetto. L'analisi dei dati di RT-PCR rivela che l'IFN $\gamma$  aumenta di quattro volte raggiungendo il picco a 1  $\mu$ M per NIV e a 4  $\mu$ M per DON con un aumento di tre volte (Fig. 13B); allo stesso modo i trascritti di IL-2 raggiungono il valore massimo a 1 $\mu$ M per NIV ed il plateau a 2  $\mu$ M per DON, (Fig.13A).

Per la IL-8, si registra un aumento di due volte con entrambe le micotossine nell'intero range di concentrazione (Fig. 13C). Successivamente, sono stati valutati gli effetti di concentrazioni crescenti della miscela NIV+DON sull'espressione delle citochine. Incubando cellule Jurkat con concentrazioni crescenti della miscela delle due micotossine, si osserva lo stesso profilo di espressione dell'mRNA di IL-2 rilevato per il NIV da solo; tuttavia i valori massimi vengono raggiunti a concentrazioni inferiori (0.5  $\mu$ M) (Fig. 13B), lasciando ipotizzare, di conseguenza, un'interazione tra le due micotossine.

È stato, inoltre, interessante notare come nella miscela, alle concentrazioni più elevate, prevale l'effetto inibitorio di NIV rispetto a quello induttivo di DON. Analogamente, anche per i trascritti di IFN $\gamma$  si osserva lo stesso profilo di espressione rilevato quando le cellule sono state incubate con il solo NIV; anche in questo caso i valori

massimi vengono raggiunti a concentrazioni inferiori (Fig. 13A). I livelli di trascritto per la IL-8, in presenza della miscela, risultano essenzialmente simili a quelli osservati con le singole micotossine (Fig. 13C).



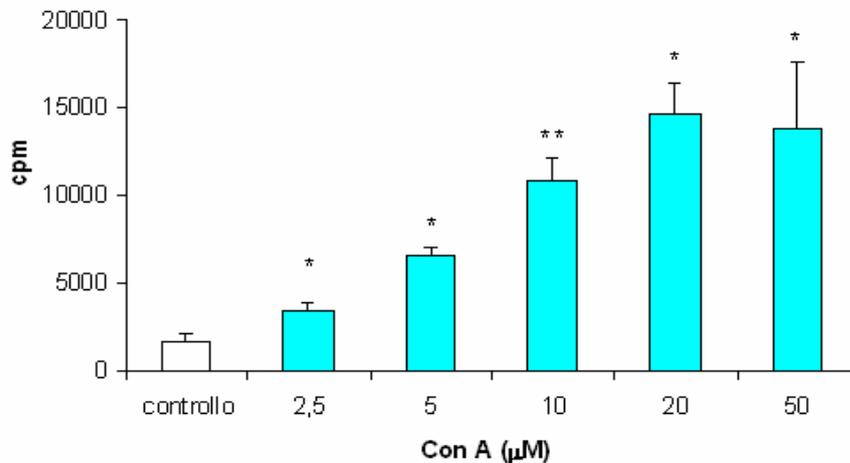
**Figura 13.** Effetti di concentrazioni crescenti di NIV e DON, singolarmente e in combinazione, sull'espressione di mRNA delle citochine. Cellule Jurkat, stimolate con PMA e ionomicina, sono state incubate con concentrazioni crescenti di NIV, DON e NIV+DON per 24h. I livelli di mRNA di IL-2 (A), IFN $\gamma$  (B), IL-8 (C) e della proteina costitutiva L-32 sono stati valutati mediante RT-PCR semi-quantitativa. Gli amplificati sono stati poi analizzati su gel d'agarosio al 2% (D). I risultati sono espressi come rapporto mRNA citochine/L32 e rappresentato uno di tre esperimenti indipendenti.

### 3 – RISULTATI – Linfociti di suino

#### 3.9 Influenza della concanavalina A sulla proliferazione.

Prima di valutare gli effetti delle fusariotossine in esame sui linfociti di suino, che costituiscono il secondo sistema cellulare utilizzato in questo studio, è stato necessario eseguire degli esperimenti preliminari al fine di individuare la concentrazione ottimale di concanavalina A (Con A) utilizzata come mitogeno.

La figura 14 mostra come il trattamento dei campioni di sangue con concentrazioni crescenti di Con A (da 2.5 a 50  $\mu\text{g/ml}$ ) induce un aumento, statisticamente significativo, della proliferazione linfocitaria che risulta essere dose-dipendente fino alla concentrazione di 20  $\mu\text{g/ml}$ . Questo esperimento ci ha permesso di stabilire che 10  $\mu\text{g/ml}$  risulta essere la concentrazione di ConA ottimale per l'induzione della proliferazione linfocitaria.

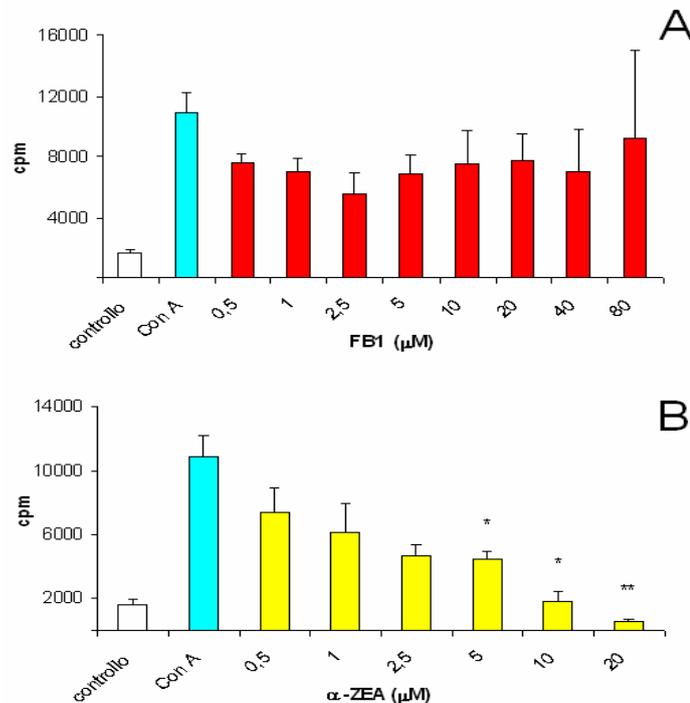


**Figura 14.** Effetti della concanavalina A (Con A) sulla proliferazione dei linfociti di suino. Sono stati utilizzati 26 suini come donatori di sangue. I campioni di sangue dopo essere stati diluiti 1:20 con RPMI, sono stati dispensati (100ul) in pozzetti da 96 in presenza e assenza di concentrazioni crescenti di Con A, per 24h. La sintesi di DNA è stata misurata mediante incorporazione di [ $^3\text{H}$ ]-timidina ed espressa in conte per minuto (cpm). Ogni valore rappresenta la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti..

\*= P < 0.05; \*\*=P<0.01:vs controllo.

### 3.10 Influenza di FB1 e $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione linfocitaria.

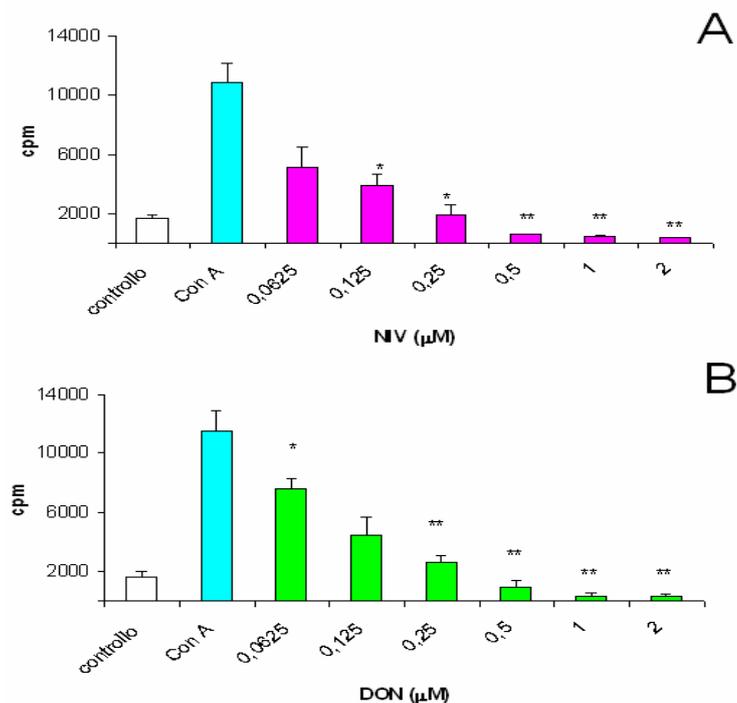
Nella figura 15 sono riportati i risultati ottenuti in seguito alla incubazione dei campioni di sangue con le due micotossine, FB1 e  $\alpha$ -ZEA. Concentrazioni crescenti di FB1, comprese in un range da 0.5 a 80  $\mu$ M, sembrano non avere alcun effetto significativo sulla capacità proliferativa dei linfociti di suino (Fig. 15A), nonostante sia stato utilizzato un ampio range di concentrazione. Il trattamento con concentrazioni crescenti di  $\alpha$ -ZEA (da 0.5 a 20  $\mu$ M), invece, induce un marcato effetto inibitorio sulla proliferazione; tale effetto sembra essere dose-dipendente e diventa statisticamente significativo a partire dalla concentrazione di 5  $\mu$ M (Fig. 15B).



**Figura 15** Effetti di FB1 e  $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione dei linfociti di suino. Sono stati utilizzati 26 suini come donatori di sangue I campioni di sangue intero diluito (100ul) sono stati dispensati in pozzetti da 96, in presenza e assenza di concentrazioni crescenti di FB1 (A) e  $\alpha$ -ZEA (B) per 24h. La sintesi di DNA è stata misurata mediante incorporazione di [ $^3$ H]-timidina ed espressa in conte per minuto (cpm). Ogni valore rappresenta la media  $\pm$  SD di tre esperimenti indipendenti.. Il controllo negativo è costituito da sangue intero non stimolato e il controllo positivo (Con A) da sangue stimolato e non incubato con le micotossine. \*= P < 0.05; \*\*=P<0.01:vs Con A

### 3.11 Influenza di NIV e DON sulla proliferazione.

Anche in questo secondo sistema cellulare abbiamo valutato la concentrazione minima di NIV e DON in grado di influenzare la proliferazione linfocitaria, utilizzando l'incorporazione della [<sup>3</sup>H]-timidina come indicatore della sintesi del DNA. La figura 16A mostra che il trattamento dei linfociti con concentrazioni crescenti di NIV (da 0.0625 a 2μM) per 24h, induce una forte inibizione della proliferazione, che risulta essere dose-dipendente e statisticamente significativa già alla concentrazione più bassa utilizzata. Anche l'incubazione con DON, per 24h, determina un marcato effetto inibitorio della proliferazione, che risulta, tuttavia, essere meno accentuato rispetto a quello indotto da NIV alla concentrazione più bassa utilizzata (Fig. 16B).

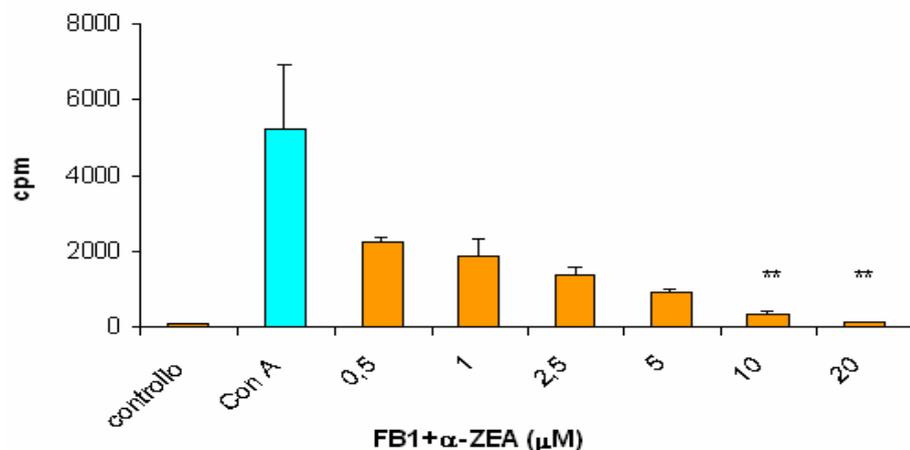


**Figure 16.** Effetti di NIV e DON sulla proliferazione di linfociti di suino. I campioni di sangue intero diluito (100ul) sono stati dispensati in pozzetti da 96, in presenza e assenza di concentrazioni crescenti di NIV(A) e DON (B) per 24h. La sintesi di DNA è stata misurata mediante incorporazione di [<sup>3</sup>H]-timidina ed espressa in conte per minuto (cpm). Ogni valore rappresenta la media ± SD di tre esperimenti indipendenti., in cui sono stati utilizzati campioni di sangue provenienti da 26 suini complessivamente. Il controllo negativo è costituito da sangue intero non stimolato e il controllo positivo da sangue stimolato e non incubato con le micotossine. \*= P < 0.05; \*\*=P<0.01:vs Con A

### 3.12 Effetti della co-incubazione FB1 + $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione.

E' stato successivamente valutato l'effetto della co-incubazione di FB1 +  $\alpha$ -ZEA, in rapporto 1:1, sulla proliferazione di linfociti di suino, in un range da 0,5 a 20 $\mu$ M. I risultati ottenuti sono riportati nella figura 17, in cui si può notare come le due micotossine quando sono presenti contemporaneamente esercitano un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare che risulta essere maggiore di quello prodotto da  $\alpha$ -ZEA da sola..

Nella co-incubazione infatti il 50% della inibizione della proliferazione lo si ottiene alla concentrazione più bassa ovvero 0,5 $\mu$ M FB1 + 0,5 $\mu$ M  $\alpha$ -ZEA, mentre lo stesso effetto lo si ottiene con una concentrazione di  $\alpha$ -ZEA pari a 2.5 $\mu$ M. Anche in questo caso l'interazione tra le due micotossine è di tipo sinergico. C'è da sottolineare, tuttavia, che i risultati ottenuti con la co-incubazione delle due micotossine sono da considerarsi preliminari a causa del ridotto numero dei campioni analizzati.

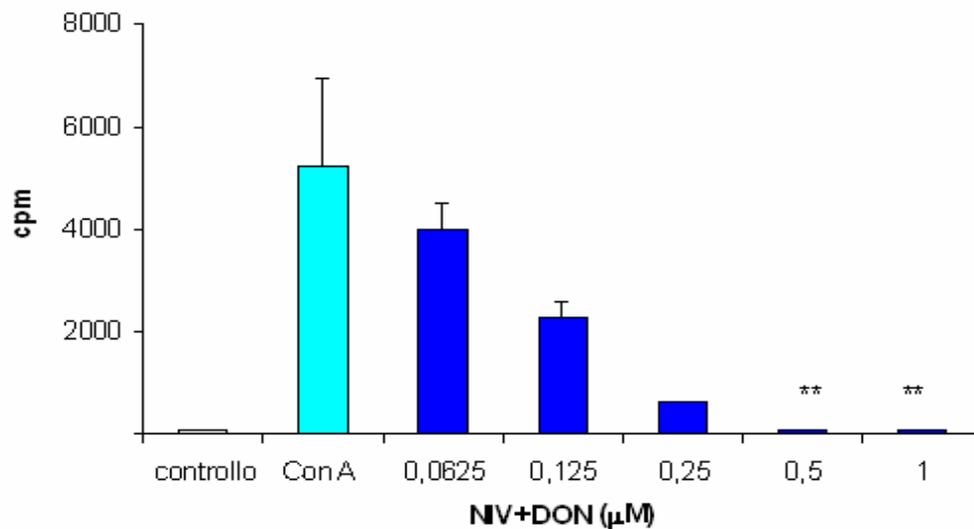


**Figura 17.** Effetti della co-incubazione FB1+ $\alpha$ -ZEA sulla proliferazione dei linfociti di suino. Sono stati utilizzati 6 suini come donatori di sangue I campioni di sangue intero diluito (100ul) sono stati dispensati in pozzetti da 96, in presenza e assenza di concentrazioni crescenti di FB1 +  $\alpha$ -ZEA per 24h. La sintesi di DNA è stata misurata mediante incorporazione di [ $^3$ H]-timidina ed espressa in conte per minuto (cpm). Ogni valore rappresenta la media  $\pm$  SD di due esperimenti indipendenti. Il controllo negativo è costituito da sangue intero non stimolato e il controllo positivo (Con A) da sangue stimolato e non incubato con le micotossine. \*\*= $P < 0.01$ :vs Con A

### 3.13 Effetti della co-incubazione NIV+ DON sulla proliferazione.

Infine, sono stati analizzati gli effetti della co-incubazione di NIV + DON sulla proliferazione dei linfociti di suino. Nella figura 18, sono illustrati i risultati ottenuti in seguito al trattamento dei campioni di sangue con concentrazioni crescenti della miscela delle due fusariotossine, in un range da 0,0625 a 1  $\mu\text{M}$ , per 24h.

Come si può notare le due micotossine, anche associate, esercitano un effetto inibitorio sulla proliferazione cellulare. Tale effetto inibitorio però non deriva dalla somma dei singoli effetti inibitori, in quanto risulta essere meno accentuato di quelli prodotti dalle due sostanze somministrate singolarmente.



**Figura 18.** Effetti della co-incubazione NIV +DON sulla proliferazione di linfociti di suino. Sono stati utilizzati 6 suini come donatori di sangue. I campioni di sangue intero diluito (100ul) sono stati dispensati in pozzetti da 96, in presenza e assenza di concentrazioni crescenti di NIV+ DON per 24h. La sintesi di DNA è stata misurata mediante incorporazione di [ $^3\text{H}$ ]-timidina ed espressa in conte per minuto (cpm). Ogni valore rappresenta la media  $\pm$  SD di due esperimenti indipendenti. Il controllo negativo è costituito da sangue intero non stimolato e il controllo positivo (Con A) da sangue stimolato e non incubato con le micotossine. \*\*= $P < 0.01$  vs Con A.

## **Discussione e Conclusioni.**

In questi ultimi anni, sono stati sviluppati diversi saggi *in vitro* su colture di cellule di mammifero, al fine di limitare l'uso di animali da laboratorio sia in ragione dei maggiori costi che l'uso di questi comporta, sia per problemi di ordine etico (Cetin e Bullerman, 2005). L'uso di colture cellulari offre diversi vantaggi rispetto ad altri metodi soprattutto in termini di quantificazione degli effetti tossici e di definizione della specificità d'organo, legata ad una azione preferenziale su un particolare tipo cellulare. Inoltre, gli attuali sistemi di analisi, basati soprattutto su valutazioni chimico-fisiche non hanno in giusta considerazione il potenziale rischio che le co-contaminazioni di micotossine comportano sia sulla salute dell'uomo che degli animali.

Nel presente lavoro abbiamo valutato l'effetto di quattro fusariotossine FB1,  $\alpha$ -ZEA, NIV e DON, sia singolarmente che in combinazione, sulla funzione immune, attraverso l'analisi *in vitro* degli effetti esercitati in cellule Jurkat e in linfociti di suino. Le cellule Jurkat sono state a lungo utilizzate come valido modello di cellula T per diversi studi immunologici, come la caratterizzazione del recettore della IL-2 e di molecole coinvolte nella trasduzione del segnale. Tuttavia, le cellule Jurkat sono pur sempre cellule trasformate e come tali la loro capacità di rispondere a stimoli esterni risulta alterata (Astoul et al., 2001), cosicché i dati ottenuti sulle cellule Jurkat hanno bisogno di un'attenta interpretazione prima di essere estrapolati alla normale biologia della cellula T. In considerazione di ciò abbiamo utilizzato, come secondo modello sperimentale, linfociti di suino, anche a motivo dell'elevata sensibilità che questa specie mostra nei confronti delle micotossine esaminate.

FB1 è una micotossina prodotta principalmente da *Fusarium verticilloides* e causa l'inibizione della ceramide sintasi provocando l'accumulo delle basi sfingoidi. Inoltre, la capacità di FB1 di modulare i pathways di trasduzione del segnale gioca un ruolo di rilievo nell'esplicare la sua tossicità (Gopee et al., 2004). Gli effetti delle fusariotossine sulle funzioni immuni sono ben noti in letteratura (Berek et al., 2001; Calamine et al., 2003; Pestka et al., 2005). Studi recenti hanno investigato l'effetto di FB1 sulla modulazione dell'espressione citochinica in cellule di sangue periferico, indicando che FB1 fa diminuire la sintesi di IL-4 e fa aumentare quella di IFN $\gamma$  (Taranu et al., 2005).

Di particolare interesse, è risultato il trattamento di topi con FB1 che ha prodotto un aumento selettivo dell'espressione di citochine di tipo Th-1 pro-infiammatorie, (IL-12, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ ), lasciando inalterata l'espressione delle citochine di tipo Th-2 (IL-4, IL-6 e IL-10), alterando così il profilo citochinico (Bhandari et al., 2002). Tra le citochine, TNF $\alpha$  sembra giocare un ruolo importante nella tossicità di FB1 *in vivo*, poiché l'espressione del suo trascritto risulta aumentata nel fegato e nel rene di topi trattati con FB1 (He et al., 2001). Studi finalizzati ad investigare se l'accumulo delle basi sfingoidi e l'induzione di TNF $\alpha$  fossero eventi tra loro correlati, hanno dimostrato che il trattamento di cellule renali di suino con la sfingosina o con la sfinganina non altera in modo significativo l'espressione di TNF $\alpha$  (He et al., 2001). Inoltre, è stato osservato che l'accumulo delle basi sfingoidi, in seguito al trattamento con FB1, blocca la sintesi degli sfingolipidi ma non previene l'induzione dell'espressione di TNF $\alpha$  e ciò sta ad indicare che l'aumento dell'espressione di TNF $\alpha$ , indotto da FB1, è un fenomeno indipendente dall'accumulo delle basi sfingoidi, indotto dall'inibizione della ceramide sintasi (He et al., 2001). Tuttavia, noi abbiamo dimostrato che FB1 lascia inalterato il profilo delle citochine nelle cellule Jurkat stimulate con mitogeno, mentre a basse concentrazioni determina un aumento significativo della proliferazione di tali cellule. Questi dati sono in accordo con uno studio condotto su fibroblasti murini, nei quali si osserva un aumento della sintesi di DNA in seguito al trattamento con FB1 (Schroeder et al., 1994). D'altra parte, FB1 sembra non avere alcun effetto significativo sulla proliferazione di linfociti di suino, pur avendo utilizzato un ampio range di concentrazione. Tali risultati trovano comunque, conferma in studi condotti su linfociti di pollo, in cui il trattamento di FB1 non aveva prodotto alcun effetto sulla proliferazione di tali cellule stimulate con mitogeno (Keck et al., 2006). Altri Autori hanno, invece, osservato che FB1 nelle cellule intestinali di suino determina una significativa riduzione della crescita cellulare a concentrazioni tali da non essere citotossiche (Bouhet et al., 2004). Le divergenze tra i nostri dati e quelli presenti in letteratura possono trovare spiegazione nella differente natura delle cellule esaminate, nelle differenti concentrazioni delle tossine analizzate, come pure nella diversa suscettibilità verso le micotossine esistente tra specie diverse. In particolare i nostri dati suggeriscono che nelle cellule Jurkat, FB1 influenza positivamente la proliferazione cellulare mentre  $\alpha$ -

ZEA causa inibizione della proliferazione, indotta essenzialmente da meccanismi apoptotici, in entrambi i modelli cellulari utilizzati in questo studio. Considerato che, per la sua particolare struttura, l' $\alpha$ -ZEA si lega ai recettori per gli estrogeni, i nostri dati sono in accordo con alcuni studi che indicano che le cellule Jurkat sono sensibili al trattamento con gli estrogeni (McMurray et al., 2001). Secondo le nostre osservazioni, l'inibizione dell'espressione di IL-2 e di IFN $\gamma$ , indotta da  $\alpha$ -ZEA, potrebbe trovare spiegazione nel meccanismo estrogeno-simile della micotossina (McMurray et al., 2001). Poichè la proliferazione dei linfociti T è essenzialmente mediata da IL-2, l'inibizione osservata potrebbe essere considerata un meccanismo primario di immunosoppressione indotto da  $\alpha$ -ZEA.

E' di particolare interesse notare che la combinazione di FB1 e  $\alpha$ -ZEA, che frequentemente si ritrova sui substrati alimentari, determina un'evidente inibizione della proliferazione cellulare in entrambi i sistemi utilizzati. Bisogna, tuttavia, precisare che i risultati ottenuti su linfociti di suino e relativi alle interazioni tra le micotossine sono da ritenersi preliminari, in considerazione del ridotto numero di campioni utilizzati per valutare l'effetto delle co-incubazioni. Nelle cellule Jurkat in particolare, i nostri risultati mostrano che la combinazione di  $\alpha$ -ZEA con due differenti dosi di FB1 dà luogo ad un'interazione di tipo sinergico, statisticamente significativa.

Questi risultati, in accordo con quelli riportati in letteratura (Tajima et al., 2002), assumono particolare rilevanza se si considera che l' $\alpha$ -ZEA si ritrova comunemente associata ad altre micotossine, quali FB1 e tricoteceni. In uno studio, è stato osservato come due tricoteceni, T-2 e HT-2 hanno effetto antagonista quando esaminati singolarmente, ma in associazione l'effetto diventa sinergico (Koshinsky e Khachatourians, 1992).

L'individuazione di una concentrazione minima in grado di provocare effetti tossici nell'uomo rappresenta un obiettivo di primaria importanza nello studio sulle micotossine; di conseguenza nel presente lavoro si è cercato inizialmente di individuare una concentrazione minima di NIV e DON sufficiente ad alterare la proliferazione cellulare nonché capace di modulare la produzione delle citochine esaminate.

Per entrambi i tricoteceni, i risultati ottenuti, sia su cellule Jurkat che su linfociti di suino, dimostrano un'attività inibente la proliferazione cellulare *in vitro*, e ciò è in accordo con altri studi, i quali identificano i tricoteceni come potenti inibitori della proliferazione cellulare (Nasri et al., 2006; Cetin et al., 2005; Minervini et al., 2005; Rocha et al., 2005; Minervini et al., 2004; Holme et al., 2003; Meky et al., 2001). Tale inibizione sembra essere correlata alla capacità dei tricoteceni di legarsi ai ribosomi degli eucarioti inibendo così la sintesi proteica (Danicke et al., 2006; Goyarts et al., 2006; Rotter et al., 1996).

I risultati ottenuti dimostrano, inoltre, che l'inibizione della proliferazione cellulare viene indotta *in vitro* a concentrazioni molto basse (0.5 $\mu$ M per NIV e 1 $\mu$ M per DON nelle cellule Jurkat; 0.0625 $\mu$ M per entrambi nei linfociti di suino), in accordo con i livelli che possono essere rinvenuti nei tessuti di topi trattati con tali composti (Yang et al., 2000). Di particolare interesse, risultano gli effetti della combinazione di NIV e DON sulle cellule Jurkat, ciò suggerisce una possibile interazione tra i due tricoteceni considerando l'ulteriore inibizione della proliferazione cellulare osservata, in accordo con altri dati presenti in letteratura (Minervini et al., 2004; Tajima et al., 2002; Thuvander et al., 1999). Tale risultato appare particolarmente interessante se si considera che la co-contaminazione dei substrati alimentari è molto frequente e che essa si verifica di solito per basse concentrazioni di micotossina. L'induzione dell'apoptosi, confermata dall'aumento dei livelli della caspasi 3 nelle cellule esposte alle concentrazioni più elevate di micotossina, suggerisce che l'inibizione della proliferazione cellulare, indotta da NIV e DON, è mediata essenzialmente da processi apoptotici, come confermano altri studi condotti su tricoteceni (Pestka et al., 2005A; Nagase et al., 2001; Yang et al., 2000) che evidenziano l'insorgenza di una condizione di stress nelle cellule trattate con tali composti. In particolare, è stato riportato che DON induce un'attivazione prolungata della proteina p38, (Yang et al., 2000), ed è noto, inoltre, che un'attivazione prolungata delle protein chinasi attivate da mitogeni (MAPK) può portare all'espressione di geni critici per l'induzione del processo apoptotico (Nasri et al., 2006).

Considerata la capacità inibente la proliferazione cellulare, sono stati valutati gli effetti di NIV e DON sull'espressione delle citochine in cellule Jurkat. Sono ancora del tutto carenti in letteratura studi riguardo gli effetti di tali fusariotossine sui livelli di mRNA

di citochine in linfociti umani. I risultati del presente lavoro dimostrano che tali micotossine sono in grado di influenzare in maniera diversa l'espressione dei trascritti delle citochine di tipo Th-1 esaminate. In particolare NIV sembra esercitare un duplice effetto, induttivo a basse concentrazioni (0,0625-2  $\mu\text{M}$ ) ed inibitorio alle concentrazioni più elevate (8 $\mu\text{M}$ ). L'effetto induttivo può essere spiegato ipotizzando che, analogamente ad altri tricoteceni, il nivalenolo possa aumentare l'attività di legame di fattori di trascrizione nucleare, come NF-kB e AP-1, attraverso l'attivazione di MAPK (Li et al., 2000). Inoltre, è possibile ipotizzare che i ridotti livelli di IFN $\gamma$  e IL-2 alla concentrazione di 8  $\mu\text{M}$  siano dovuti all'attivazione di specifici pathways inibitori. Infatti, l'inibizione della sintesi proteica indotta da NIV non può da sola spiegare tale risultato poiché, alla stessa concentrazione, è stato riscontrato un aumento dei livelli di mRNA di IL-8.

I risultati inerenti l'attività del deossinivalenolo sull'espressione di IL-2 e IL-8 concordano con quelli attualmente presenti in letteratura che descrivono un incremento dell'espressione delle due citochine in cellule Jurkat (Pestka et al., 2005a). Inoltre i nostri risultati dimostrano un'induzione anche di IFN $\gamma$  mediata da DON, seppur inferiore rispetto a quella osservata per NIV. Ad alte concentrazioni, i due tricoteceni inducono effetti differenti sull'espressione di IFN $\gamma$  e IL-2; in particolare, è stato osservato che mentre NIV esercita un'attività inibente, DON mostra un'attività induttiva alla concentrazione di 8  $\mu\text{M}$ . Considerato che i due tricoteceni hanno una struttura chimica molto simile che differisce solo per la presenza di un gruppo -OH nel nivalenolo in posizione C7, i nostri risultati dimostrano che tale differenza è di fondamentale importanza nel modulare finemente le funzioni linfocitarie alla concentrazione di 8  $\mu\text{M}$ . In particolare, la capacità di DON di stimolare l'espressione di IL-2 rappresenta un risultato molto importante a causa del ruolo centrale di tale citochina nel processo di maturazione dei linfociti T, in condizioni fisiologiche e/o in casi di flogosi.

Poiché la contaminazione di prodotti vegetali, in particolare dei cereali, destinati all'alimentazione umana ed animale da parte di più tricoteceni, soprattutto NIV e DON, rappresenta la condizione che maggiormente si riscontra in condizioni naturali (Schollenberger et al., 2006; Larsen et al., 2004; Schothorst et al., 2004), è risultato molto interessante analizzare l'effetto, indotto nelle cellule Jurkat, in seguito a co-incubazione

con entrambe le micotossine, NIV e DON, sull'espressione delle citochine. I risultati hanno evidenziato un'interazione tra le due fusariotossine a basse concentrazioni (0.0625-0.5  $\mu$ M) sull'espressione di IFN $\gamma$  e IL-2, analogamente a quanto già osservato nei nostri test di proliferazione; mentre è stato interessante notare che, alle più alte concentrazioni prevale l'effetto di NIV, indicando che quest'ultimo agisce da inibitore competitivo di DON nel modulare l'espressione di IFN $\gamma$  e IL-2.

Per quanto riguarda i livelli di espressione di IL-8 in seguito a co-incubazione di cellule Jurkat con entrambi i tricoteceni, i risultati confermano l'effetto induttivo osservato in seguito al trattamento dei tricoteceni singolarmente, e non evidenziano alcun ulteriore aumento, come conseguenza della co-incubazione.

Nella co-incubazione NIV+DON, l'induzione dell'inibizione avviene a dosi più basse, pertanto, si evidenzia, un effetto di tipo additivo tra le due fusariotossine (Minervini et al., 2004; Tajima et al., 2002; Thuvander et al., 1999). Tale risultato appare particolarmente interessante se si considera che la co-contaminazione dei substrati alimentari è molto frequente e che essa si verifica di solito per basse concentrazioni di micotossina.

E' da notare che nel caso dei linfociti suini le micotossine sono state utilizzate a concentrazioni più basse rispetto a quelle utilizzate con le Jurkat, e tale differenza di trattamento ha prodotto risultati simili in entrambi i sistemi, a dimostrazione che una cellula tumorale risulta "più resistente" di una cellula normale. Dunque, l'aspetto più sorprendente è dato dal fatto che i risultati ottenuti con i due sistemi cellulari sono pressochè simili e sovrapponibili. Infatti, FB1 risulta essere la micotossina con gli effetti più contrastanti (o ha un effetto stimolatorio o non ha alcun effetto) e comunque non inibitori, e ciò è in accordo con i dati della letteratura (Tajima et al., 2002; Schroeder et al., 1994). L'associazione FB1 con  $\alpha$ -ZEA causa un potenziamento dell'attività di  $\alpha$ -ZEA e risulta in una interazione di tipo sinergico in entrambi i sistemi cellulari utilizzati. Inoltre,  $\alpha$ -ZEA, NIV e DON, da soli o in combinazione inducono sempre inibizione della proliferazione sia nelle cellule Jurkat che nei linfociti di suino stimolati con mitogeno. Tale inibizione può essere più o meno forte a seconda della micotossina utilizzata e ciò ci ha permesso di definire una "scala" di tossicità in cui NIV risulta essere più tossico di DON

che a sua volta è più tossico di  $\alpha$ -ZEA. Anche questi risultati sono stati ottenuti in entrambi i sistemi cellulari e concordano pienamente con quelli presenti in letteratura. (Cetin e Bullerman, 2005; Tajima et al., 2002).

In conclusione, il presente lavoro di tesi ha confermato le attività immunomodulatorie esercitate dalle fusariotossine prese in esame, e ha dimostrato il potenziale rischio delle co-contaminazioni, condizione molto frequente in natura e che, a tutt'oggi non è tenuta nella giusta considerazione. Inoltre, i risultati ottenuti sono in accordo con precedenti studi condotti su linfociti T normali, presenti in letteratura (Forsell et al., 1985; Meky et al., 2001; Rocha et al., 2005) e ciò conferma la validità dei modelli cellulari *in vitro* utilizzati in questo studio. Alla luce dei dati ottenuti, appare, dunque, di rilevante importanza lo studio delle interazioni possibili tra le diverse micotossine, in particolare tra quelle che più frequentemente contaminano i substrati alimentari e i loro derivati come le fusariotossine, largamente diffuse in Europa e in gran parte del mondo. Tali studi, inoltre, possono fornire utili informazioni anche al fine di ottimizzare le dosi giornaliere tollerabili e i livelli massimi tollerati negli alimenti destinati all'uomo e agli animali.

## Bibliografia

- Abnet, C.C., Borkowf, C.B., Qiao, Y.L., Albert, P.S., Wang, E., Merrill, A.H. Jr, Mark, S.D., Dong, Z.W., Taylor, P.R., Dawsey, S.M. 2001. Sphingolipids as biomarkers of fumonisin exposure and risk of esophageal squamous cell carcinoma in China. *Cancer Causes Control* 12: 821-828.
- Astoul, E., Edmunds, C., Cantrell, D.A., Ward, S.G. 2001. PI 3-K and T-cell activation: limitations of T-leukemic cell lines as signaling models. *Trends Immunol.* 22:490-496.
- Berek, L., Petri, I.B., Mesterhazy, A., Teren, J., Molnar, J. 2001. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol. in Vitro* 15: 25-30
- Bhandari, N., Brown, C.C., Sharma, R.P. 2002. Fumonisin B1-induced localized activation of cytokine network in mouse liver. *Food Chem. Toxicol.* 40: 1483-1491.
- Bondy, G.S., Pestka, J.J. 2000. Immunomodulation by fungal toxins. *J. Toxicol. Environ. Health. Part B, Critical Reviews* 3: 109-143.
- Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., Galtier, P., Mengheri, E., Oswald, I.P. 2004. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicol. Sci.* 77: 165-171.
- Bretz M., Beyer M., Cramer B., Knecht A., Humpf H.U. 2006. Thermal degradation of Fusarium mycotoxin deoxynivalenol. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6445-6451.
- Calemine, J., Zalenka, J., Karpuzoglu-Sahin, E., Ward, D.L., Lengi, A., Ahmed, S.A. 2003. The immune system of geriatric mice is modulated by estrogenic endocrine disruptors (diethylstilbestrol, alpha-zearalanol, and genistein): effects on interferon-gamma. *Toxicology* 194, 115-128.
- Cetin Y., Bullerman L.B. 2005. Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassays. *Food Chem. Toxicol.* 43: 755-764.
- Charoenpornsook K., Fitzpatrick J.L., Smith J.E. 1998. The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mycopathologia* 143: 105 – 111.
- Cheeke, P.R. 1998. Mycotoxins in cereal grains and supplements. In: Cheeke, P.R., (Eds.), *Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous plants*, Interstate Publishers Inc, Danville, IL, pp. 87-136.

- Choi CY, Nakajima-Adachi H, Kaminogowa S, Sugita-Konishi Y. 2000. Nivalenol inhibits total and antigen-specific IgE production in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 165:94-8.
- Colvin, B.M., Harrison, L.R. 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. *Mycopathologia.* 117:79-82.
- Creppy, E.E. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 127:19-28.
- D'Mello, J.P.F., Mac Donald, A.M.C. 1997. Mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69: 155-166.
- D'Mello, D., Mehta D., Pereira, J. Rao, C.V. 1999. A toxicity study of simultaneous administration of Tamoxifen and Diazepam to female Wistar rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 51:549-553.
- Diekman, M.A., Green, M.L. 1992. Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Animal Sci.* 70: 1615-1627.
- Dresden-Osborne C., Noblet GP. 2002. Fumonisin B1 affects viability and alters nitric oxide production of a murine macrophage cell line. *Int Immunopharmacol.* 2(8):1087-93.
- Eskola M, Parikka P, Rizzo A. 2001. Trichothecenes, ochratoxin A and zearalenone contamination and fusarium infection in Finnish cereal samples in 1998. *Food Addit Contam* 18:707-18.
- Forsell JH, Pestka JJ. 1985 Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis.. *Appl Environ Microbiol.* 50:1304-7.
- Gelderblom, W.C., Kriek, N.P., Marasas, W.F., Thiel, P.G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the Fusarium moniliforme metabolite, fumonisin B1, in rats. *Carcinogenesis.* 12:1247-1251
- Gopee, N.V., Sharma, R.P. 2004. The mycotoxin fumonisin B1 transiently activates nuclear factor-kappaB, tumor necrosis factor alpha and caspase 3 via protein kinase C alpha-dependent pathway in porcine renal epithelial cells. *Cell Biol. Toxicol.* 20:197-212.
- Goyarts T., Danicke S., Rothkotter H.J., Spilke J., Tiemann U., Schollenberger M. 2005. On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively, *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.*, 52: 305-314.

- Goyarts T., Grove N., Danicke S. 2006. Effects of Fusarium toxin deoxynivalenol from naturally contaminated wheat given subchronically or as one single dose on the in vivo protein synthesis of peripheral blood lymphocytes and plasma proteins in the pig. *Food Chem. Toxicol.* 44:1953-1965.
- Gutleb A.C., Morrison E., Murk A.J. 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. *Environ. Toxicol. and Pharm.* 11: 309 -320.
- Hamalainen HK, Tubman JC, Vikman S, Kyrola T, Ylikoski E, Warrington JA, Lahesmaa R. 2001. Identification and validation of endogenous reference genes for expression profiling of T helper cell differentiation by quantitative real-time RT-PCR. *Anal Biochem.*; 299:63-70.
- Harvey, R.B., Edrington, T.S., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E. 1995. Influence of aflatoxin and fumonisin B1-containing culture material on growing barrows. *Am. J. Vet. Res.* 56:1668-1672.
- Hazel C.M., Patel S. 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Letters.* 153: 51-59.
- He, Q., Riley, R.T., Sharma, R.P. 2001. Fumonisin-induced tumor necrosis factor-alpha expression in a porcine kidney cell line is independent of sphingoid base accumulation induced by ceramide synthase inhibition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 174: 69-77.
- Heussner A.H., Dietrich D.R., O'Brien E. 2006. In vitro investigation of individual and combined cytotoxic effects of ochratoxin A and other selected mycotoxins on renal cells. *Toxicol In Vitro.* 20(3):332-41.
- Holme J.A., Morrison E., Samuelsen J.T., Wiger R., Lag M., Schwarze P.E. 2003. Mechanisms involved in the induction of apoptosis by T-2 and HT-2 toxins in HL-60 human promyelocytic leukaemia cells. *Cell Biol. Toxicology.* 19: 53-68.
- Hussein H.S., Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicol.* 167 : 101-134.
- Igarashi, H., Kouro, T., Yokota, T., Comp, P.C., Kincade, P.W. 2001. Age and stage dependency of estrogen receptor expression by lymphocyte precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 98:15131-15136.
- Jenkins JK., Suwannaroj S., Elbourne KB., Ndebele K., McMurray RW. 2001. 17- $\beta$ -Estradiol alters Jurkat lymphocyte cell cycling and induces apoptosis through suppression of Bcl-2 and cyclin A. *Int Immunopharmacol.* 1897-1911

- Keck BB., Bodine AB. 2006. The effects of fumonisin B1 on viability and mitogenic response of avian immune cells. *Poult Sci.* 858(6):1020-1024.
- Kellerman TS., Marasas W.F., Thiel PG., Gelderblom WC., Cawod M., Coetzer JA. 1990. Leukoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B1. *Onderstepoort J Vet Res.* 57(4):269-75.
- Koaudio J.H., Mobio T. A., Baudrimont I., Moukha S., Dano S.D., Creppy E.E. 2005. Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology.* 213(1-2):56-65.
- Koshinsky, H.A., Khachatourians, G.G 1992. Trichothecene synergism, additivity, and antagonism: the significance of the maximally quiescent ratio. *Nat. Toxins* 1, 38-47.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., Watanabe, H. 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol.* 7: 253-306.
- Kuiper-Goodman, T. 1998. Food Safety: Mycotoxins and Phytotoxins in Perspective. In: Miraglia, M., van Egmond, H., Brera, C., Gilbert, J. (Eds.), *Mycotoxins and Phycotoxins. Developments in Chemistry, Toxicology and Food Safety*, Alaken Inc, Fort Collins, CO, pp. 25-48.
- Larsen J.C., Hunt J., Perrin I., Ruckebauer P. 2004 Workshop on trichothecenes with a focus on DON: summary report. *Toxicol. Lett.* 153: 1-22.
- Li YC., Ledoux DR., Bermudez AJ., Fritsche KL., Rottinghaus GE. 2000. The individual and combined effects of fumonisin B1 and moniliformin on performance and selected immune parameters in turkey poults. *Poult Sci.* 79(6):871-8.
- Li M, Cuff CF, Pestka J. 2005. Modulation of murine host response to enteric reovirus infection by the trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol Sci.* 87:134-45.
- Lioi M.B., Santoro A., Barbieri R., Salzano S., Ursini M.V. 2004. Ochratoxin A and zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat Res.* 557(1):19-27.
- Luongo, D., Bergamo, P., Rossi, M., 2003. Effects of conjugated linoleic acid on growth and cytokine expression in Jurkat T cells. *Immunol. Lett.* 90: 195-201.
- Marasas, W.F., 1995. Fumonisin: their implications for human and animal health. *Nat. Toxins* 3:193-198; discussion 221. Review.

Marasas WF, Riley RT., Hendricks KA., Stevens VL., Sadler TW., Gelineau van WJ., Missmer SA., Cabrera J., Torres O., Gelderblom WC., Allegood J. 2004. Fumonisin disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr.* 134(4):711-6. Review.

McMurray, R.W., Ndebele, K., Hardy, K.J., Jenkins, J., 2001. K17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. *Cytokine* 14: 324-333.

Minervini F., Fornelli F., Flynn K.M., 2004. Toxicity and apoptosis induced by mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B<sub>1</sub> in a human erythroleukemia cell line. *Toxicol. In vitro.* 18: 21 – 28.

Minervini F., Fornelli F., Lucivero G., Romano C., Visconti A. 2005. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines. *Toxicology* 210: 81 – 91.

Merrill JE., Murphy SP. 1997. Inflammatory events at the blood brain barrier: regulation of adhesion molecules, cytokines, and chemokines by reactive nitrogen and oxygen species. *Brain Behav Immun.* 11(4):245-63. Review.

Moss M.O., Thrane U. 2004. Fusarium taxonomy with relation to trichothecene formation. *Toxicol. Letters.* 153:23-28.

Nagase M., Alam M.M., Tsushima A., Yoshizawa T., Sakato N. 2001. Apoptosis induction by T-2 toxin: activation of caspase-9, caspase-3 and DFF-40/CAD through cytosolic release of cytochrome c in HL-60 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 1741-1747.

Nasri T., Bosch R.R., Voorde S., Fink-Gremmels J. 2006. Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes. *Toxicol. In Vitro.* 20: 832-840.

Oswald, I.P., Marin, D.E., Bouchet, S., Pinton, P., Taranu, I., Accensi, F. 2005. Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food Addit. Contam.* 22:354-60.

Osweiler GD., Kehrli ME., Stabel JR., Thurston JR., Ross PF., Wilson TM. 1993. Effects of fumonisin-contaminated corn screenings on growth and health of feeder calves. *J Anim Sci.* 71(2):459-66.

Ouyang YL, Li S, Pestka JJ. 1996. Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on transcription factor NF-kappa B/Rel binding activity in murine EL-4 thymoma and primary CD4<sup>+</sup> T cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 140:328-36.

- Pestka JJ, Yan D, King LE. 1994. Flow cytometric analysis of the effects of in vitro exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) on apoptosis in murine T, B and IgA<sup>+</sup> cells. *Food Chem Toxicol.* 32:1125-36.
- Pestka, J.J., Uzarski, R.L., Islam, Z. 2005. Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes. *Toxicology* 206: 207-219. (a)
- Pestka J.J., Smolinski A.T. 2005. Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 8: 39-69 (b).
- Ramasamy S., Wang E., Henning B., Merrill AH. Jr. 1995. Fumonisin B1 alters sphingolipid metabolism and disrupts the barrier function of endothelial cells in culture. *Toxicol Appl Pharmacol.* 133(2):343-8.
- Rheeder, J.P., Marasas, W.F. 1998. Fusarium species from plant debris associated with soils from maize production areas in the Transkei region of South Africa. *Mycopathologia.* 143:113-119.
- Rocha O., Ansari K., Doohan F.M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. *Food Addit. Contam.* 22: 369-378.
- Rotter B.A., Prelusky D.B., Pestka J.J. 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin), *J. Toxicol. Environ. Health.* 48: 1-34.
- Schoental, R. 1983. Precocious sexual development in Puerto Rico and oestrogenic mycotoxins (zearalenone). *Lancet* 1: 537.
- Schothorst R.C., van Egmond H.P. 2004. Report from SCOOP task 3.2.10 "collection of occurrence data of fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Subtask: trichothecenes, *Toxicol. Lett.* 153: 133-143.
- Schroeder, J.J., Crane, H.M., Xia, J., Liotta, D.C., Merrill, A.H. Jr. 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. A molecular mechanism for carcinogenesis associated with *Fusarium moniliforme*. *J. Biol. Chem.* 269:3475-3481.
- Shifrin V.I., Anderson P. 1999. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen activated protein kinase and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274: 13985-13992.
- Speijers, G.J.A, Speijers, M.H.M. 2004. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol. Lett.* 153: 91-98.

- Stalder M., Birsan T., Hausen B., Borie DC., Morris RE. 2005. Immunosuppressive effects of surgery assessed by flow cytometry in nonhuman primates after nephrectomy. *Transpl Int.* 10:1158-65.
- Steinman R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual Review of Immunology.* 9: 271-296.
- Tajima, O., Schoen, E.D., Feron, V.J., Groten, J.P. 2002. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of *Fusarium* mycotoxins for possible interactions. *Food Chem. Toxicol.* 40: 685-695.
- Taranu, I., Marin, D.E., Bouhet, S., Pascale, F., Bailly, J.D., Miller, J.D., Pinton, P., Oswald, I.P. 2005. Mycotoxin fumonisin B1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol. Sci.* 84: 301-307.
- Theumer MG., Lopez AG., Masih DT., Chulze SN., Rubistein HR. 2003. Immunobiological effects of AFB1 and AFB1-FB1 mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Toxicology.* 186(1-2):159-70.
- Tipton, D.A., Lyle, B., Babich, H., Dabbous, M.K. 2003. In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells. *Toxicol. in Vitro.* 17: 301–310.
- Yancy H., Ayers SL., Farrell DE., Day A., Myers MJ. 2001. Differential cytokine mRNA expression in swine whole blood and peripheral blood mononuclear cell cultures. *Vet Immunol Immunopathol.* 79(1-2):41-52.
- Yang G.H., Jarvis B.B., Chung Y.J., Pestka J.J. 2000. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK and SAPK/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164: 149-160.
- Yoo HS., Norred WP., Riley RT. 1996. Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 138(2):211-8.