

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISION DE ESTUDIOS SUPERIORES

60214

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE METABOLITOS DE ✓
Aspergillus tamarii y A. parasiticus
SOBRE LINFOCITOS HUMANOS EN CULTIVO

TESIS QUE PRESENTA

REGLA MARIA AROCHE ALFONSO

PARA OPTAR AL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

MEXICO, 1979



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi esposo Manuel,

por brindarme todo su apoyo

A mi hijo Eduardo,

por ser la sonrisa más hermosa
que la vida me ha ofrecido

A mi mamá,

por el amor que me otorga
al cuidar de mi niño

A mi papá,

por enseñarme lo que es
un ser independiente

A Dalia,

por su valor.

A

Blas y Soledad

por su bondad.

A

Irene y Pepe

por el infinito que nos une.

En especial deseo dedicar parte de este trabajo

al Dr. Teófilo Herrera Suárez

y además manifestarle las gracias

por hacer posible mi examen Doctoral

A la Doctora Cristina Pérez Amador, con mi cariño

A las Doctoras

Aurora Brunner Liebshard y Evangelina Pérez Silva

por brindarme su amistad

Al Dr. Antonio Peña Díaz, por su deseo de ser justo

A todos mis maestros y también

a mis alumnos, gracias.

Mis sinceros agradecimientos :

- A los Doctores Jesús Manuel León Cázares, Cristina Pérez Amador y Federico García, por su asesoría en esta tesis.
- Al Dr. León Cázares, por su contribución en mi formación académica.
- A los Doctores C. W. Hesseltine, R. D. Stubblefield y O. L. Shotwell, por haberme proporcionado amablemente las cepas y el estándar utilizados en este trabajo.
- A los Profesores Dra. Cristina Pérez Amador, Dr. Teófilo Herrera Suárez, Dra. Martha Zenteno Zevada, Dr. José -- Miguel Betancourt Rule, Dra. Evangelina Pérez Silva, Dra. Luz María López De la Rosa, Dr. Miguel Ulloa Sosa, por su participación, consejos, colaboración y revisión de esta tesis.
- A la M. en C. Sandra Luz Gómez Arroyo, por sus comentarios y sugerencias tan valiosos en este trabajo.
- A la Sra. Q.B.P. Alba Tuena de Cobos, por su ayuda en los momentos difíciles.
- A Moises Cervantes Aguilar, por sus constantes servicios bibliotecarios.
- A Francisco y Lupita Cervantes, con estimación, por su ayuda en diferentes situaciones.
- A todas aquellas personas que de momento . . .
he olvidado.

C O N T E N I D O

	Pág.
I. Introducción	1
II. Objetivos	13
III. Material y Métodos	15
IV. Resultados	26
V. Discusión y Conclusiones	60
VI. Resumen	82
VII. Literatura Citada	85

I N T R O D U C C I O N

Los hongos son organismos eucariontes y heterotróficos que presentan una amplia variedad de formas y habilidad para crecer en diversos habitats como saprobios, parásitos o simbioses. Su estructura básica es un talo filamentoso o su equivalente en las formas amiboides y unicelulares (Smith, 1975; Ulloa y Hanlin, 1978). Substancias esenciales para los procesos biosintéticos de crecimiento y desarrollo son absorbidas del medio ambiente y durante la multiplicación celular participan en la formación de metabolitos primarios como son las proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos. Durante la fase final de crecimiento exponencial, cuando se acumulan precursores metabólicos primarios como acetato, malonato, piruvato y diversos tipos de aminoácidos, se producen sustancias químicamente diferentes denominadas metabolitos secundarios. Mientras que el metabolismo primario es básicamente el mismo para todos los sistemas vivos, el metabolismo secundario puede caracterizar sub-especies, especies, o grupos de especies (Maggon et al., 1977).

Como un grupo, los hongos han probado ser particularmente productivos en sus metabolitos secundarios; sin

embargo, esta productividad además de ser específica genotípicamente lo es fenotípicamente, lo cual determina su extrema sensibilidad a las condiciones ambientales (Bu'Lock, 1975). Por otro lado, su capacidad para crecer en diferentes substratos influenciados por un amplio rango de factores, ha originado la diversidad bioquímica de tales metabolitos dentro de los que se incluyen productos como quinonas, antibióticos, alcaloides y otros.

Diversos aspectos relacionados con la biosíntesis, estructura química y actividad biológica de dichos compuestos han sido estudiados por diferentes disciplinas; especialmente, desde el punto de vista de la toxicología, los metabolitos tóxicos producidos por los hongos se han definido como micotoxinas (Wogan, 1975; Christensen, 1975; Moreau, 1974; Butler, 1975). Antibióticos tales como la penicilina y la estreptomicina, también son considerados micotoxinas; sin embargo, el término "antibiótico" es aplicado a compuestos producidos por microorganismos que son tóxicos a otros microorganismos, mientras que el término "micotoxina" es aplicado a productos metabólicos producidos por hongos que son tóxicos para las plantas y los animales incluyendo al hombre (Christensen, 1975). Las micotoxicosis son las intoxicaciones resultantes

de la ingestión de micotoxinas, localizadas en mayor proporción en el material o substrato utilizado por los hongos para su crecimiento, que en el micelio o en las esporas.

Moreau (1974), consideró 12 géneros y alrededor de 50 variedades de substratos, así como diversos animales sensibles a las toxinas producidas por estos hongos.

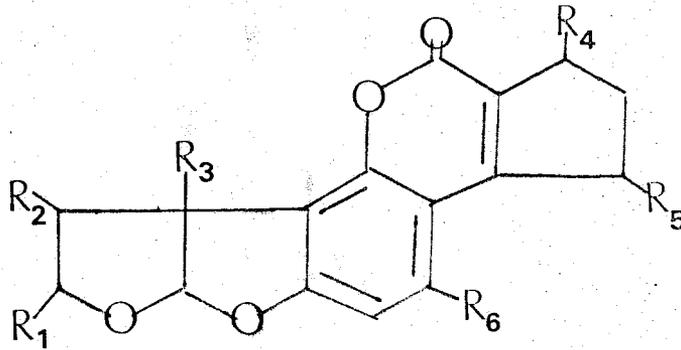
Por otra parte, la producción de sustancias intracelulares (endotoxinas) por macromicetos venenosos o diversos micromicetos parásitos de plantas, también son considerados micotoxinas; sin embargo, la intoxicación resultante conocida también como micetismo, se produce al consumir una moderada cantidad de los tejidos del hongo que contiene las toxinas (Christensen, 1975).

Con respecto a la producción de las micotoxinas es importante considerar y valorar los factores ambientales que determinan su presencia o degradación y los factores genéticos que son responsables de las variaciones encontradas en la productividad de una toxina en un mismo género y especie, así como también, su intervención en la sensibilidad o resistencia individual a la acción de la toxina (Davis y Diener, 1970; Jemmali, 1969; Moreau et al., 1965).

En los estudios realizados para registrar la presencia de estas sustancias se utilizan diversos criterios; algunos de éstos son considerados más importantes, así, por ejemplo, la especificidad de los efectos tóxicos producidos sobre un organismo permite la detección de micotoxinas como la fusariotoxina y la esporidesmina (Scott, 1965). La utilización simultánea de diversos medios de cultivos selectivos y condiciones de crecimiento permiten detectar la totalidad de la microflora de un determinado alimento; el aislamiento e identificación de los hongos, además de la práctica de la intoxicación experimental y el registro de las toxinas responsables por medio de la cromatografía, la espectroscopía y en algunos casos la fluorodensitometría, incluyendo una prueba biológica como indicador de la relación entre la estructura química y su actividad biológica, proveen de manera integral una interpretación correcta de los resultados y conclusiones obtenidos (Fishbein y Falk, 1970; Peters y Sumner, 1953; Goldblatt, 1970; Brown, 1970).

Dentro de los géneros de hongos más estudiados desde los puntos de vista anteriormente citados se encuentra el género Aspergillus, este género ha sido clasificado en orden

sistemático por grupos (Raper y Fennell, 1973) y recientemente Moreau (1974) consideró 17 grupos, dentro de éstos algunas cepas de las especies del grupo A. flavus, como A. flavus Link y A. parasiticus Speare han adquirido una atención considerable debido a la constancia y mayor producción de metabolitos altamente tóxicos, conocidos con el nombre genérico de aflatoxinas. Estos compuestos capaces de inducir sobre algunos sistemas biológicos efectos carcinogénicos (Newberne et al., 1966; Enomoto y Saito, 1972; Aleksandrowicz y Smyk, 1971), teratogénicos (Ellis y DiPaolo, 1967) y mutagénicos (Lilly, 1965; Ong, 1975), se presentan en dos grupos principales de aflatoxinas con una serie de derivados (Figs. 1 y 2). Las aflatoxinas B₁, B₂, B_{2a}, M₁, G₁, G₂ y G_{2a} han sido aisladas de cultivos de hongos y/o de alimentos contaminados. Algunas de éstas, así como también los derivados restantes, son metabolitos producidos por animales o tejidos animales a partir de las toxinas principales, además de que en condiciones in vitro pueden ser registradas utilizando microsomas de hígado de pájaros, roedores y primates, incluyendo al hombre (Patterson, 1973; Masri et al., 1974; Büchi et al., 1974; Dalezios et al., 1971).



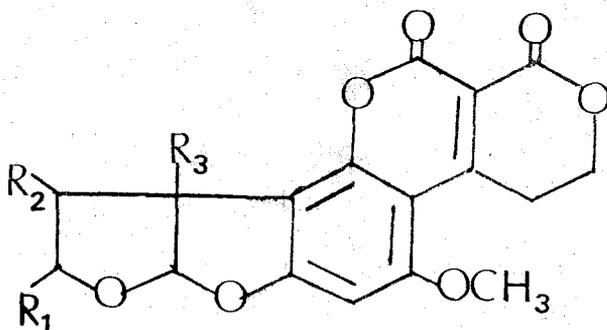
Aflatoxina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
B ₁	H	H	H	=O	H	OCH ₃
B ₂	H ₂	H ₂	H	=O	H	OCH ₃
B _{2a}	HOH	H ₂	H	=O	H	OCH ₃
M ₁	H	H	OH	=O	H	OCH ₃
M ₂	H ₂	H ₂	OH	=O	H	OCH ₃
P ₁	H	H	H	=O	H	OH ₃
Q ₁	H	H	H	=O	OH	OCH ₃
R _o	H	H	H	OH	H	OCH ₃

Fig. 1. Aflatoxina B₁ y sus derivados (Wogan, 1975).

Diversos autores (Swenson et al., 1974; Wogan, 1973) han situado a las aflatoxinas como un interesante grupo de sustancias estructuralmente homólogas, que pueden ofrecer importantes respuestas involucradas generalmente con las relaciones existentes entre su estructura química y su actividad biológica.

Desde el punto de vista de sus efectos carcinogénicos, las aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y M₁ inducen la formación de tumores en el hígado de diversas especies animales; sin embargo, el nivel de dosis efectiva requerida para la inducción varía en cada una de ellas.

Los resultados obtenidos sobre sus efectos tóxicos y bioquímicos, consistentemente indican una actividad decreciente en orden B₁ > G₁ > B₂ > G₂ sobre sistemas in vivo utilizando patos, larvas de peces, embriones de pollo, etc., y en sistemas in vitro empleando cultivos de diversas células de mamíferos. Se ha descrito un orden de potencia similar sobre su habilidad para acoplarse al ADN, alterar procesos bioquímicos in vitro e inducir cambios funcionales en el hígado de rata (Wogan, 1973).



Aflatoxina	R ₁	R ₂	R ₃
G ₁	H	H	H
G ₂	H ₂	H ₂	H
G _{2a}	OH	H ₂	H
GM ₁	H	H	OH

Fig. 2. Aflatoxina G₁ y sus derivados (Wogan, 1975)¹.

Colectivamente, esta información indica que la molécula de aflatoxina presenta dos sitios funcionales importantes como determinantes de sus actividades biológicas. Los sustituyentes fusionados al núcleo cumarínico determinan diferencias en la potencia de actividad entre las configuraciones B y G (Figs. 1 y 2). Un indicador de la importancia de esta parte de la molécula es el hecho de que la aflatoxina R_0 es menos potente que la B_1 . Frecuentemente existe una marcada evidencia para considerar importante el segmento dihidrofurofurano de la aflatoxina B; compuestos que pierden esta porción son inactivos en diversos sistemas investigados; por otro lado, la reducción del doble enlace del anillo furano terminal (B_1 en relación a B_2 ; B_2 en relación a B_{2a}) produce una significativa reducción de su potencia. Estos datos son consistentes con el mecanismo postulado sobre la activación metabólica de estas sustancias utilizando microsomas de hígado de roedores, de tal modo que el derivado resultante probado en diversos sistemas biológicos es más potente que la molécula original (Garner et al., 1972; Garner, 1973). En lo que se refiere a la hidroxilación en la posición 4 (B_1 en relación a M_1), parece no afectar la toxicidad pero

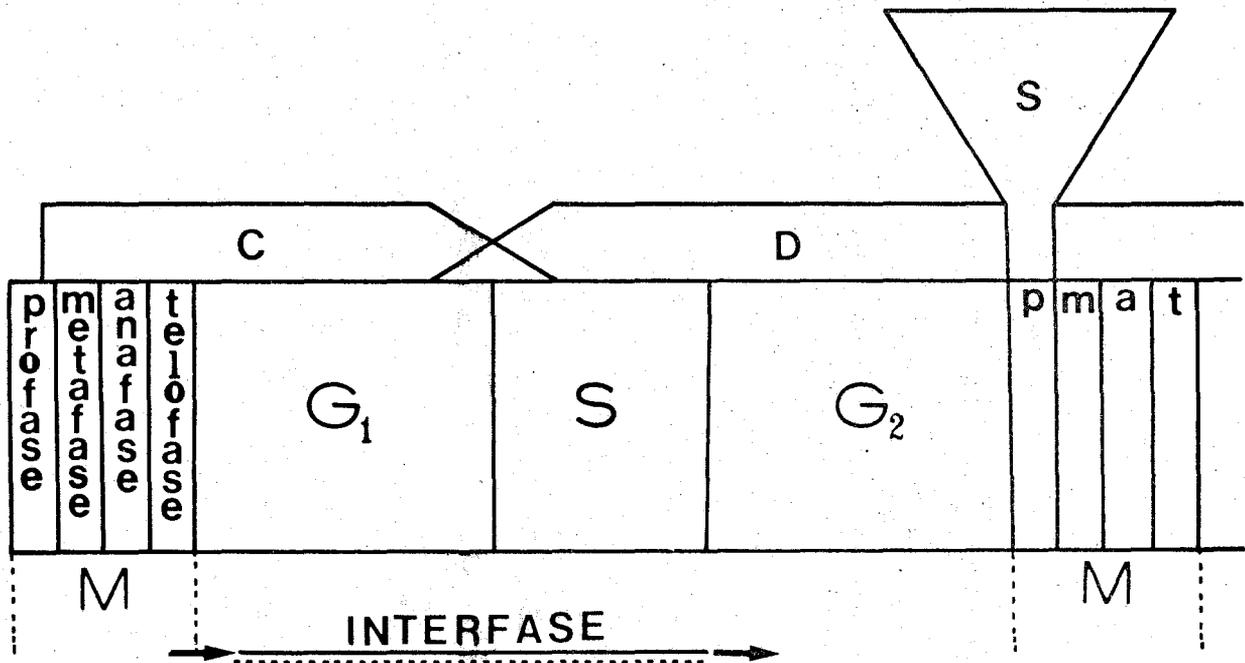
reduce aproximadamente en un 30% la potencia carcinogénica de M_1 (Wogan, 1975).

Ahora bien, la evaluación de los efectos mutagénicos producidos por las aflatoxinas, mediante la observación de las anormalidades cromosómicas mitóticas en cultivos de células (Dolimpio et al., 1968) y la posibilidad de predecir estos efectos in vivo, basándose en los resultados obtenidos in vitro (Heddle, 1969), han determinado que este análisis sea considerado como un indicador biológico a nivel de población celular que permite una estimación del grado de daño producido. Algunos estudios han situado al cultivo de linfocitos de la sangre periférica, como un tejido celular adecuado para la evaluación de los efectos clastogénicos (rompimiento cromosómico) inducidos por agentes físicos, químicos y/o biológicos (Shaw, 1970; Legator, 1973).

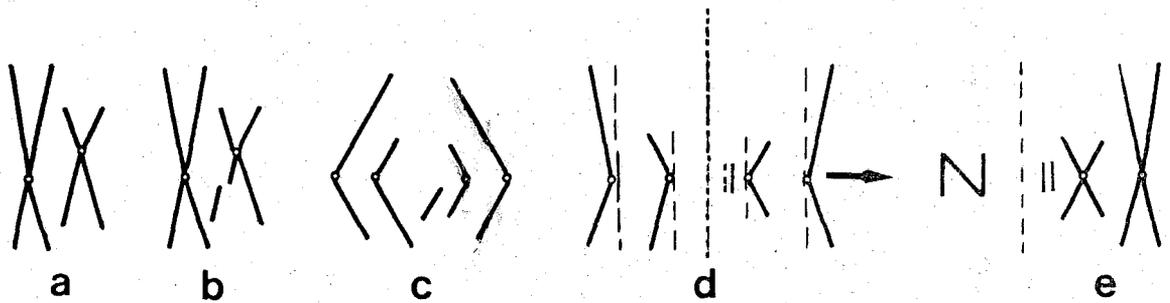
Estos efectos pueden ser evaluados citológicamente detectando sobre las metafases somáticas rompimientos de tipo cromosómico y cromatídico. Cuando los leucocitos, específicamente los linfocitos se encuentran en la fase de mitosis (G_0), o en el período G_1 de la interfase, se producen rompimientos de tipo cromosómico como consecuencia de su ex

posición a un determinado agente mutagénico; sin embargo, si la acción de este compuesto se efectúa en los estados del ciclo celular S o G₂, después de que el cromosoma se ha replicado y ha originado dos cromátidas hermanas, se producen rompimientos de tipo cromatídico. De este modo, en el rompimiento cromosómico la unidad de rompimiento y de intercambio es el cromosoma completo (ambas cromátidas en el mismo locus), mientras que en el cromatídico únicamente la cromátida se observa afectada. Frecuentemente, las aberraciones de tipo cromosómico observadas en la segunda división mitótica pueden derivarse de una duplicación de aberraciones que fueron inicialmente de tipo cromatídico (Fig. 3). Es interesante hacer notar que otros agentes pueden producir únicamente alteraciones cromatídicas, aunque las células hayan sido expuestas a éstos en los períodos G₀ o G₁, debido principalmente a la especificidad de su acción sobre algunos de los estados del ciclo celular en células eucarióntes (Evans y O'Riordan, 1975).

Con base en lo expuesto anteriormente y considerando que, en condiciones naturales, debido a la ingestión de alimentos contaminados y/o a la inhalación de conidios u



(A)



(B)

Fig. 3. Relación entre el tipo de aberración y estado en el ciclo celular en que actúa un clastógeno (A). M, mitosis; C, rompimiento cromosómico; D, rompimiento cromatídico; S, rompimiento subcromatídico. (B). rompimiento cromosómico derivado de un cromatídico: - a, cromosomas normales en G₂; b, alteración cromatídica en la primera metafase; c, anafase; d, replicación durante la interfase y e, aberración cromosómica en la metafase siguiente; N, célula con cromosomas sin daño. (Evans et al., 1975, modificado por la autora).

otras estructuras fúngicas, muchos sistemas biológicos, incluyendo al hombre están expuestos a las micotoxinas producidas por diversos hongos y entre éstos se encuentran algunas de las especies representantes del grupo A. flavus, en el presente estudio se plantearon los siguientes objetivos:

1. Al incubar cultivos de linfocitos humanos inoculados con esporas de Aspergillus parasiticus Speare (cepa productora de aflatoxinas) o con esporas de Aspergillus tamarisii Kita (cepa no productora de aflatoxinas) los efectos de las micotoxinas producidas en el medio ambiente del cultivo, podrían reflejar de una manera más natural lo que ocurre en condiciones in vivo (Aroche, 1973; León y Aroche, 1977).
2. No obstante que diversos factores del medio influyen sobre el crecimiento de los hongos y sobre su capacidad para producir micotoxinas, se consideró al medio de cultivo para linfocitos adecuado para satisfacer las necesidades requeridas por las cepas utilizadas en estos estudios; por consiguiente, los efectos producidos por las micotoxinas podrían ser entonces evaluados mediante el análisis de los cambios observados sobre el proceso

de la división celular y la morfología de los cromosomas (loc. cit.).

3. Si la infección experimental funciona como un método adecuado para detectar los efectos de las micotoxinas producidas bajo estas condiciones, el sistema podría ser útil como un indicador de la presencia de hongos productores de micotoxinas creciendo naturalmente sobre diversos substratos (loc. cit.).
4. La evaluación de la utilidad de este método implicaría la comparación de los efectos producidos por las micotoxinas formadas por el hongo naturalmente en el medio de cultivo de linfocitos y los obtenidos al agregar en el mismo sistema de cultivo las sustancias separadas y aisladas a partir de los extractos fúngicos (León et al., 1978).
5. El análisis de los efectos producidos por estas micotoxinas y otros metabolitos secundarios, unido al estudio de su estructura química y sitios funcionales, puede contribuir notablemente no sólo a nuestro conocimiento sobre la toxicología de los hongos, sino también a los estudios concernientes a la búsqueda de otras propiedades relacionadas con su actividad biológica (loc. cit.).

MATERIAL Y METODOS

Con el objeto de caracterizar en estos estudios las cepas de A. parasiticus, A. tamaraii y A. flavus en relación directa con su capacidad para producir aflatoxinas, fueron inoculadas por triplicado esporas de A. parasiticus, NRRL 2999, A. parasiticus, NRRL 465, A. tamaraii, NRRL 429 y A. flavus, NRRL 1957, en 15 ml de un medio que contenía 2% de extracto de levadura (Difco 0127-01) más 15% de sacarosa (Baker Analyzed 4072), en matraces de 125 ml que posteriormente fueron incubados a 28°C durante cinco días. Los cultivos así tratados fueron filtrados, lavados con agua destilada estéril y concentrados hasta 2-3 ml por evaporación, según la técnica de Davis et al. (1966).

Los compuestos presentes en los extractos fueron registrados por medio de cromatografía ascendente con papel Whatman No. 1, eluidos con agua destilada y un estándar múltiple para aflatoxinas NRRL 8578-76-A. Los cromatogramas fueron analizados bajo luz ultravioleta de onda larga y el patrón de bandas fluorescentes fue registrado, obteniéndose los valores Rf del estándar y de las muestras investigadas

así como una cuantificación aproximada con base en la apreciación visual de la intensidad de la fluorescencia de cada una de las bandas comparada con la del estándar.

De las cuatro cepas caracterizadas anteriormente, únicamente alícuotas de 100 μ l de los extractos crudos de A. parasiticus, NRRL 2999, de A. tamaraii, NRRL 429 y del estándar NRRL 10450-03-A fueron repetidamente cromatografiados sobre papel, eluidos con agua destilada y cromatografiados sobre gel de sílice G, eluidos con una mezcla de cloroforno-metanol-agua (97:3:1) según la técnica de Manabe et al. (1970).

Las sustancias producidas por A. tamaraii en número de tres: "a", "b" y "c", fueron separadas de los cromatogramas en papel, extraídas con agua bidestilada estéril y liofilizadas. Debido a que los valores R_f y la fluorescencia de estas sustancias no coincidieron con los registros de las aflatoxinas en el estándar, se procedió a establecer su probable estructura química, para lo cual, muestras colectadas a través de varias extracciones favorables fueron estudiadas por medio de los análisis de los espectros registrados en el ultravioleta (UV) con un espectrofotómetro

Perkin-Elmer, en el infrarojo (IR) con un Infra Cord, Perkin-Elmer y de resonancia magnética nuclear (RMN) utilizando un espectrómetro de resonancia CFT-20 Varian.

Los cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica se obtuvieron por una modificación del método convencional (Arakaki y Sparkes, 1963): sangre venosa humana fue obtenida usando una jeringa heparinizada y 0.5 ml de sangre completa fue inmediatamente adicionada a frascos ampula de 100 ml que contenían 4 ml de medio de cultivo TC-199 (Difco 5477), 1 ml de suero fetal de ternera inactivado a 60°C (Gibco 614), 0.25 ml de fitohemaglutinina "M" (Difco 0528), 0.10 ml de penicilina-estreptomina, equivalente a 1,000 U de penicilina y 1,000 µg de estreptomina (Difco 5854) y 0.10 ml de una solución de glutamina al 5% (Difco 5789).

Los experimentos fueron conducidos de la siguiente manera: esporas de A. parasiticus NRRL 2999 y de A. tamarii NRRL 429, fueron inoculadas en los frascos ampula por duplicado e incubadas durante 66 horas a 37°C. Los cultivos testigos no fueron inoculados con esporas y se procesaron simultáneamente.

Al final del período de incubación se añadieron a los cultivos 0.05 ml de una solución de 2 μ g/ml del mitostático Colcemid (Ciba, 001641); se incubaron durante 6 horas para completar un período de incubación de 72 horas, después del cual el contenido de cada frasco de cultivo se centrifugó a 150 g durante 7 minutos; se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en agua destilada estéril hasta completar 5 ml. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 15 minutos, al término de los cuales se centrifugaron a 150 g durante 7 minutos y nuevamente se desechó el sobrenadante; el paquete celular de cada tubo se resuspendió suavemente en 5 ml de fijador elaborado con metanol-ácido acético (3:1) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugaron a 150 g durante 7 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de fijador. Se repitió el lavado hasta que el paquete celular estuvo libre de hemoglobina y los tubos se dejaron 24 horas en el congelador, según la técnica propuesta por Moorhead et al. (1960). Con el contenido de cada uno de los tubos se elaboraron las preparaciones que fueron secadas al aire, teñidas con una solución de Giemsa-Leishman-agua (3:1:36) durante 20 minutos a temperatura ambiente; se enjuagaron con agua destilada y

alcohol al 50% y finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente.

El análisis efectuado tanto en los cultivos testigos como en los tratados fue el siguiente:

1. Observación de figuras mitóticas (Fig. 4) y determinación del índice mitótico, expresado como por ciento del total de células analizadas.
2. Registro del número cromosómico.
3. Análisis citogenético directo (Legator y Flamm, 1973; Evans y O'Riordan, 1975), observación y determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas o efectos clastogénicos (Shaw, 1970).
4. Registro del sitio, cromosoma y/o grupo cromosómico en los cuales las alteraciones fueron observadas.
5. La identificación de los cromosomas se realizó de acuerdo con el sistema estándar de nomenclatura de cromosomas humanos propuesto en la conferencia de Denver en 1960 (Fig. 5).

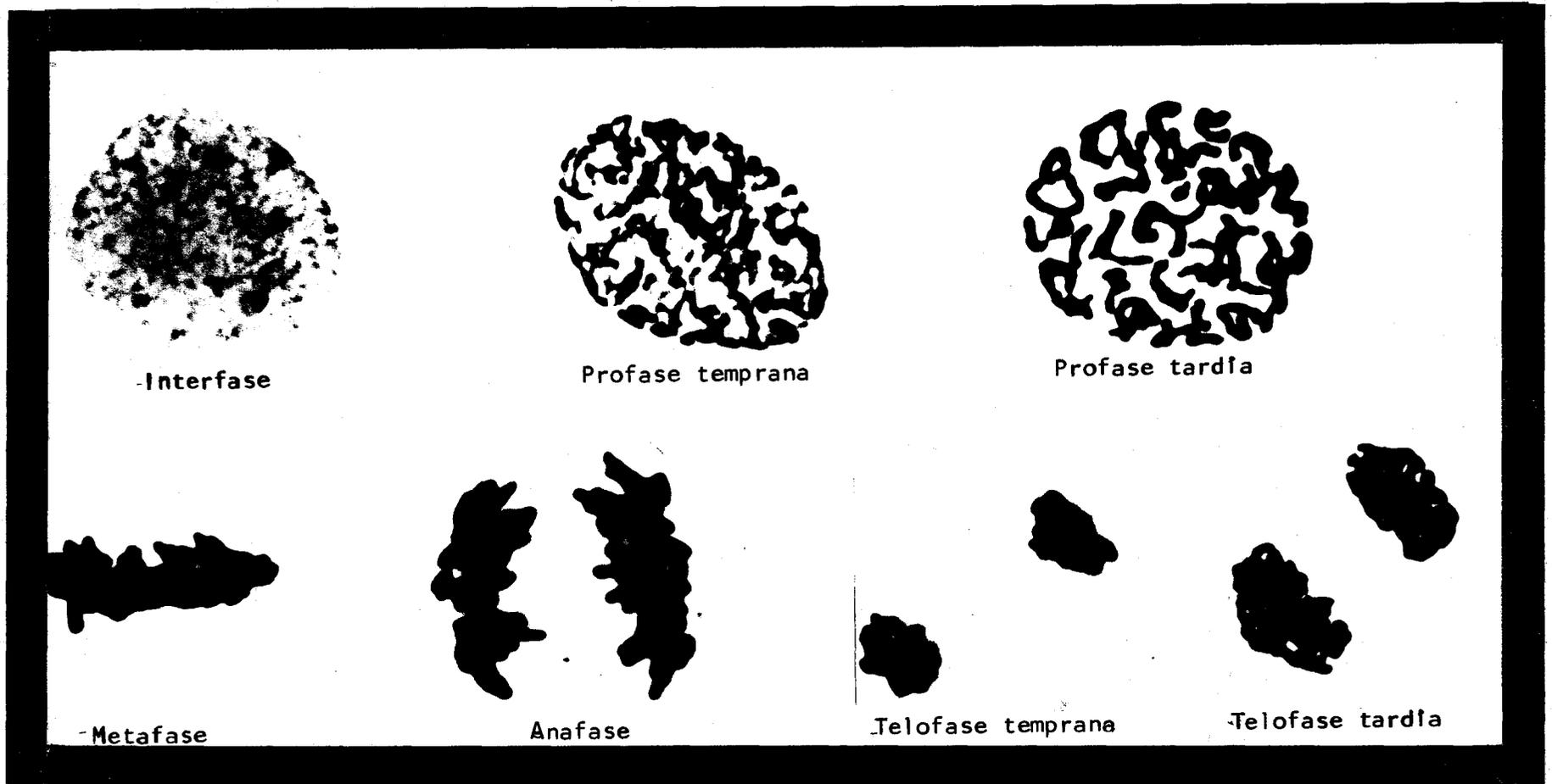


Fig. 4. Interfase y estados de la mitosis de linfocitos humanos en cultivo.

Concluído este análisis, que corresponde propiamente a la fase de la infección experimental y en vista de que los efectos de las aflatoxinas purificadas ya han sido evaluados en diferentes sistemas in vitro (Lilly, 1965; Dolimpio et al., 1968), se realizaron los experimentos para la investigación de las sustancias aisladas de A. tamarii y sus efectos sobre cultivos de linfocitos humanos. Para ello, cultivos de linfocitos humanos obtenidos mediante la metodología descrita en la fase anterior, fueron expuestos durante 72 horas por separado y en duplicado a 100 μg de la banda "a"; 60 μg de la banda "b" y a 100 μg de la banda "c". El período de incubación considerado previamente para la aplicación del mitostático, así como las etapas correspondientes a la cosecha se mantuvieron invariables. Los cultivos de linfocitos no expuestos a estas sustancias fueron considerados testigos y se procesaron simultáneamente con los tratados.

El análisis realizado tanto en los cultivos tratados como en los testigos incluyó:

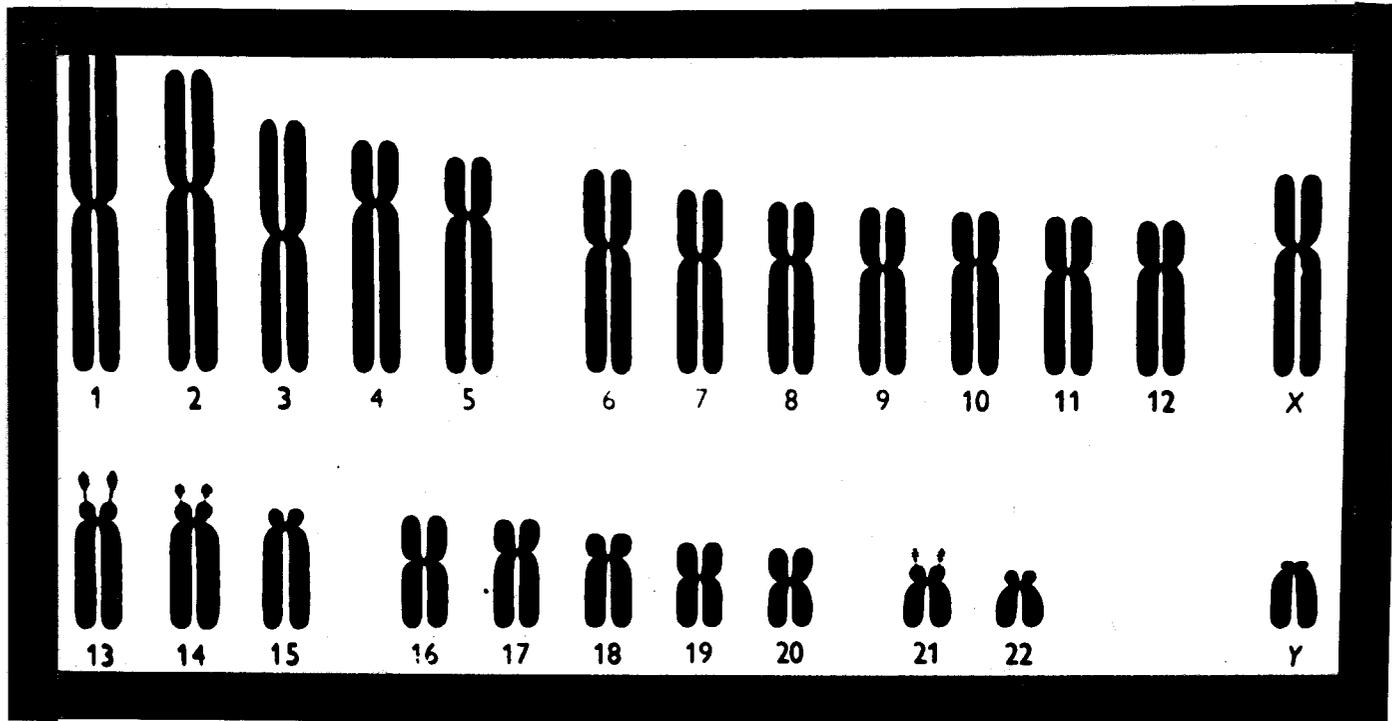


Fig. 5. Esquema de los cromosomas humanos según la clasificación de Denver (1960).

1. Observación de figuras mitóticas y determinación del índice mitótico, expresado como por ciento del total de células analizadas.
2. Registro del número cromosómico.
3. Análisis citogenético directo, observación y determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas o efectos clastogénicos.

El análisis estadístico se realizó usando la prueba de χ^2 para la distribución y significado del daño cromosómico observado en relación a la longitud del cromosoma en cultivos de linfocitos infectados con A. parasiticus.

Para conocer la significancia estadística de las diferencias observadas en los porcentajes obtenidos de los efectos sobre el índice mitótico, figuras mitóticas y daño cromosómico en relación con los testigos y entre las sustancias aisladas de A. tamaris, se utilizó la prueba de diferencias de proporciones (Spiegel, 1970), cuya desviación típica está dada por:

$$\sigma_{P_1 - P_2} = \sqrt{pq \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

$$\text{donde } p = \frac{N_1 P_1 + N_2 P_2}{N_1 + N_2}$$

$$\text{y } q = 1 - p$$

donde

P_1 y P_2 = proporciones muestrales de dos grandes muestras (porcentajes obtenidos de las observaciones)

N_1 y N_2 = tamaños de las dos muestras extraídas de las poblaciones respectivas P_1 y P_2

p = estima de la proporción poblacional

q = probabilidad de no ocurrencia de un suceso

Con la variable tipificada z dada por

$$z = \frac{P_1 - P_2}{\sigma_{P_1 - P_2}}$$

a un nivel de significación de 0.05, cuando

$$z_t = -1.645 \text{ ó } 1.645$$

Estableciendo que,

cuando $z > -1.645$ ó 1.645 , los resultados son significativos al nivel del 0.05 y las diferencias observadas se deben a la acción de la sustancia investigada, con una probabilidad de $p > 0.05$

y cuando $z < -1.645$ ó 1.645 , los resultados no son significativos a este mismo nivel y las diferencias observadas se deben al azar.

R E S U L T A D O S

El análisis cromatográfico preliminar (Fig. 6) confirmó que cuatro de las bandas de los extractos de A. parasiticus 2999 (Tabla I); y dos de A. parasiticus 465 (Tabla II) coincidieron con el estándar que contenía las cuatro principales aflatoxinas (Tabla III); sin embargo, mediante este procedimiento, la presencia de metabolitos no identificados como aflatoxinas fueron registrados en los extractos de A. tamarii 429 (Tabla IV) y en los de A. flavus 1957 (Tabla V). En las figuras 7 y 8 se muestran las bandas obtenidas de A. tamarii utilizando cromatografía en papel y en gel de sílice G, respectivamente; en la primera pueden observarse tres diferentes bandas: banda "a" con un valor Rf de 0.48 y fluorescencia azul; banda "b" con un valor Rf de 0.52 y fluorescencia amarilla, y la banda "c" con un valor Rf de 0.58 y fluorescencia verde; en la segunda se observan solamente dos de las bandas: "a" con un valor Rf de 0.33 y fluorescencia azul y "c" con un valor Rf de 0.16 y fluorescencia verde.

Por otro lado, la variabilidad observada en la producción de las bandas "a", "b" y "c", sugiere la participación de diversos factores que aparentemente ejercen una influencia particular sobre los mecanismos de inducción y/o represión de cada banda, por consecuencia estos efectos se reflejan en la

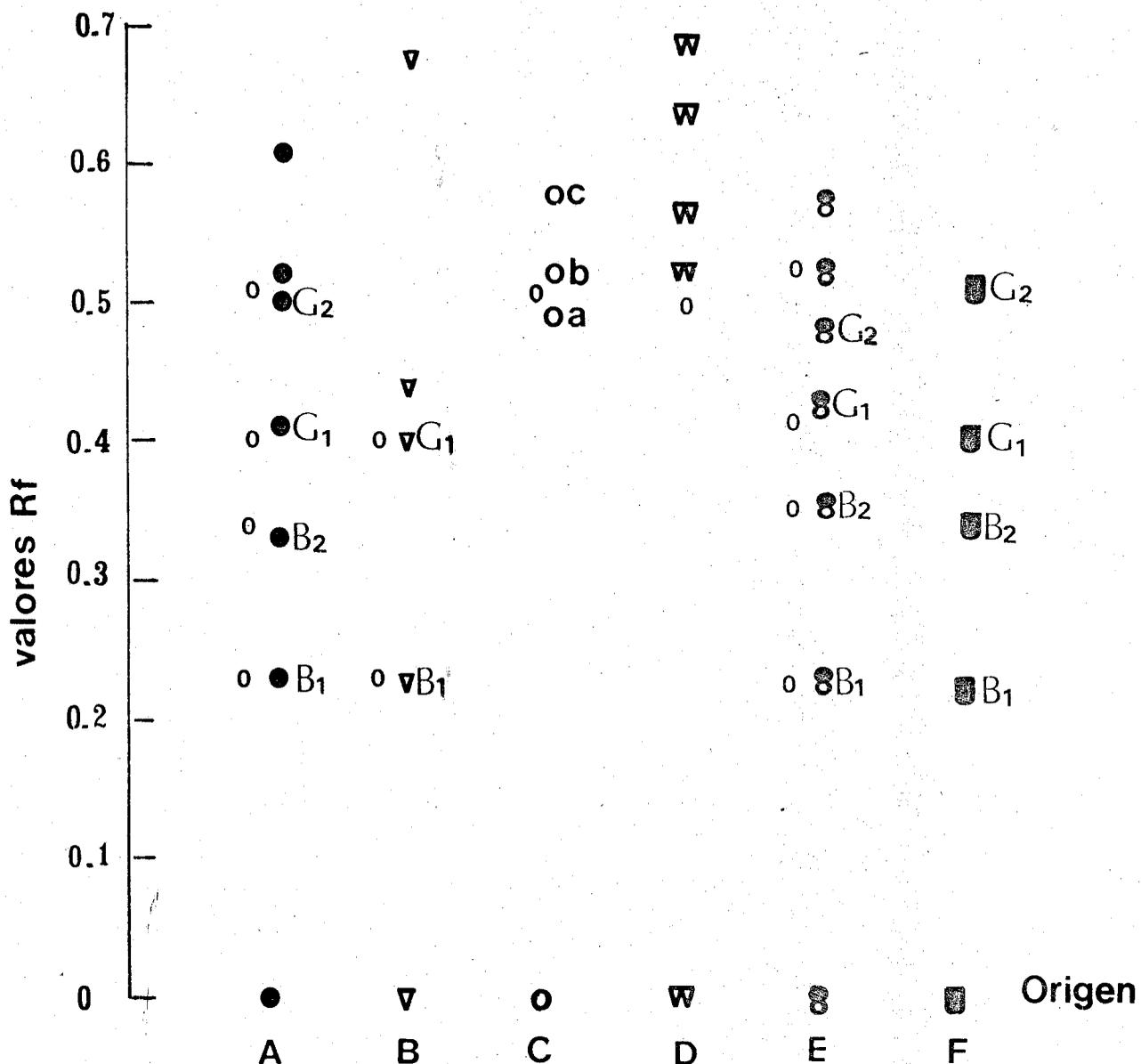


Fig. 6. Valores Rf de las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de (A) - Aspergillus parasiticus NRRL 2999; (B) Aspergillus parasiticus NRRL 465; (C) Aspergillus tamarii 429; (D) Aspergillus flavus NRRL 1957; (E) Aspergillus parasiticus NRRL 2999 con el estándar de aflatoxinas y (F) estándar de aflatoxinas.

TABLA 1

Valores Rf de las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus parasiticus NRRL 2999

		B	A	N	D	A	
		1	2	3	4	5	6
F*		azul	azul	verde	verde	amarilla	verde
2999	(Rf)	0.22	0.32	0.40	0.48	0.52	0.59
"	"	0.22	0.32	0.40	0.48	0.52	0.57
Estándar**		0.22	0.32	0.39	0.50	-	-
2999	\bar{X}	0.22	0.32	0.40	0.48	0.52	0.58
"	(Rf)	0.24	0.36	0.42	0.48	0.52	0.56
"	"	0.23	0.31	0.41	0.48	0.53	0.61
Estándar**		0.23	0.35	0.41	0.53	-	-
2999	\bar{X}	0.23	0.34	0.41	0.48	0.52	0.58
Estándar**		0.24	0.35	0.40	0.51	-	-
"	\bar{X}	0.23	0.34	0.40	0.51	-	-
2999	\bar{X}	0.23	0.33	0.41	0.50	0.52	0.58
2999	+ E**	0.23	0.35	0.42	0.48	0.52	0.57
Aflatoxina ***		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂		
Metabolito						"s"	"w"

\bar{X} Promedio

* Fluorescencia en UV de onda larga.

** Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

*** Cuantificación de las aflatoxinas con base en la apreciación visual de la intensidad de fluorescencia:

Estándar = 1

A. parasiticus 2999

2.5 µg/ml de B₁

Extracto

0.5 µg/ml de B₂

[1] = [1] (4)

2.0 µg/ml de G₁

[2] = [1] (3)

0.5 µg/ml de G₂

[3] = [1] (5)

TABLA II

Valores Rf de las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus parasiticus NRRL 465

		B	A	N	D	A	
	1	2	3	4	5	6	
F*	azul	azul	verde	verde	amarilla	verde	
465 (Rf)	0.21	-	0.39	-	-	0.73	
" "	0.25	-	0.42	-	-	0.77	
" "	0.24	-	0.43	-	-	0.73	
" "	0.23	-	0.40	-	0.44	0.56	
465 \bar{X}	0.23	-	0.40	-	0.44	0.68	
Estándar**	0.24	0.35	0.42	0.51	-	-	
"	0.23	0.35	0.41	0.53	-	-	
" \bar{X}	0.23	0.34	0.40	0.51	-	-	
465 + E**	0.22	0.32	0.39	0.50	-	-	
Aflatoxina***	B ₁	-	G ₁	-			
Metabolito					"t"	"k"	

\bar{X} Promedio

* Fluorescencia en UV de onda larga.

** Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

*** Cuantificación de las aflatoxinas con base en la apreciación visual de la intensidad de fluorescencia:

Estándar = 1

A. parasiticus 465

2.5 ug/ml de B ₁	Extracto	G ₁	B ₁
0.5 ug/ml de B ₂	[1] = [1]	(3)	[1] (.5)
2.0 ug/ml de G ₁	[2] = [1]	(2.5)	[1] (.5)
0.5 ug/ml de G ₂	[3] = [1]	(2)	[1] (.5)

TABLA III

Valores Rf de las aflatoxinas aisladas por cromatografía del estándar múltiple NRRL 8578-76-A

	B	A	N	D	A
	1	2	3	4	
F*	azul	azul	verde	verde	
8578-76-A** (Rf)	0.22	0.32	0.39	0.50	
"	0.24	0.35	0.42	0.51	
"	0.23	0.35	0.41	0.53	
" \bar{X}	0.23	0.34	0.40	0.51	

\bar{X} Promedio

* Fluorescencia en UV de onda larga.

** 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de aflatoxina B₁
 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de aflatoxina B₂
 2.0 $\mu\text{g/ml}$ de aflatoxina G₁
 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de aflatoxina G₂

calidad tanto cualitativa como cuantitativa de su obtención y determinan las características de pureza y cantidad requerida para los análisis espectroscópicos. Estos factores afectan marcadamente la presencia de las bandas "a" y "b" y no se observan como limitantes de la producción de la banda "c". Por consiguiente, la estabilidad en la producción de dicha banda permitió establecer hasta el momento una estructura química tentativa obtenida del análisis e interpretación de las señales emitidas en los espectros de UV, IR y RMN que se indican a continuación:

La absorción en el UV (Fig. 9) nos indica la presencia de un sistema insaturado con máxima absorción en:

- 1) $\lambda_h = 283 \text{ nm}$
- 2) $\lambda_{\text{Max}} = 270 \text{ nm}$
- 3) $\lambda_{\text{Max}} = 216 \text{ nm}$

Estos datos coinciden con la presencia de un cromóforo del siguiente tipo:

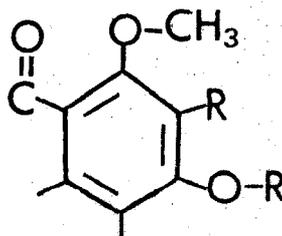


TABLA IV

Valores Rf de las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus tamaris NRRL 429

		B		A	N	D	A	
		1	2	3	4	5	6	7
F*		azul	azul	verde	azul	verde	amarilla	verde
429	(Rf)	-	-	-	0.46	-	0.51	0.52
"		-	-	-	0.47	-	0.52	0.58
"		-	-	-	0.52	-	0.56	0.64
429	\bar{X}	-	-	-	0.48	-	0.52	0.58
Estándar	**	0.22	0.32	0.39	-	0.50	-	-
"		0.24	0.35	0.42	-	0.51	-	-
"		0.23	0.35	0.41	-	0.53	-	-
"	\bar{X}	0.23	0.34	0.40	-	0.51	-	-
Aflatoxina		-	-	-		-		
Metabolito					"a"		"b"	"c"

\bar{X} Promedio

* Fluorescencia en UV de onda larga.

** Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

TABLA V

Valores Rf de las bandas aisladas por cromatografía de los cultivos de Aspergillus flavus NRRL 1957

		B	A	N	D	A			
		1	2	3	4	5	6	7	8
F*		azul	azul	verde	verde	azul	amarilla	azul	verde
1957	(Rf)	-	-	-	-	0.50	0.54	0.55	0.60
"		-	-	-	-	0.56	0.61	0.75	0.82
"		-	-	-	-	0.52	0.57	0.59	0.65
1957	\bar{X}	-	-	-	-	0.52	0.56	0.63	0.69
Estándar**		0.22	0.32	0.39	0.50	-	-	-	-
"		0.24	0.35	0.42	0.51	-	-	-	-
"	\bar{X}	0.23	0.33	0.40	0.50	-	-	-	-
Aflatoxinas		-	-	-					
Metabolito						"y"	"i"	"e"	"n"

\bar{X} Promedio

* Fluorescencia en UV de onda larga.

** Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂.

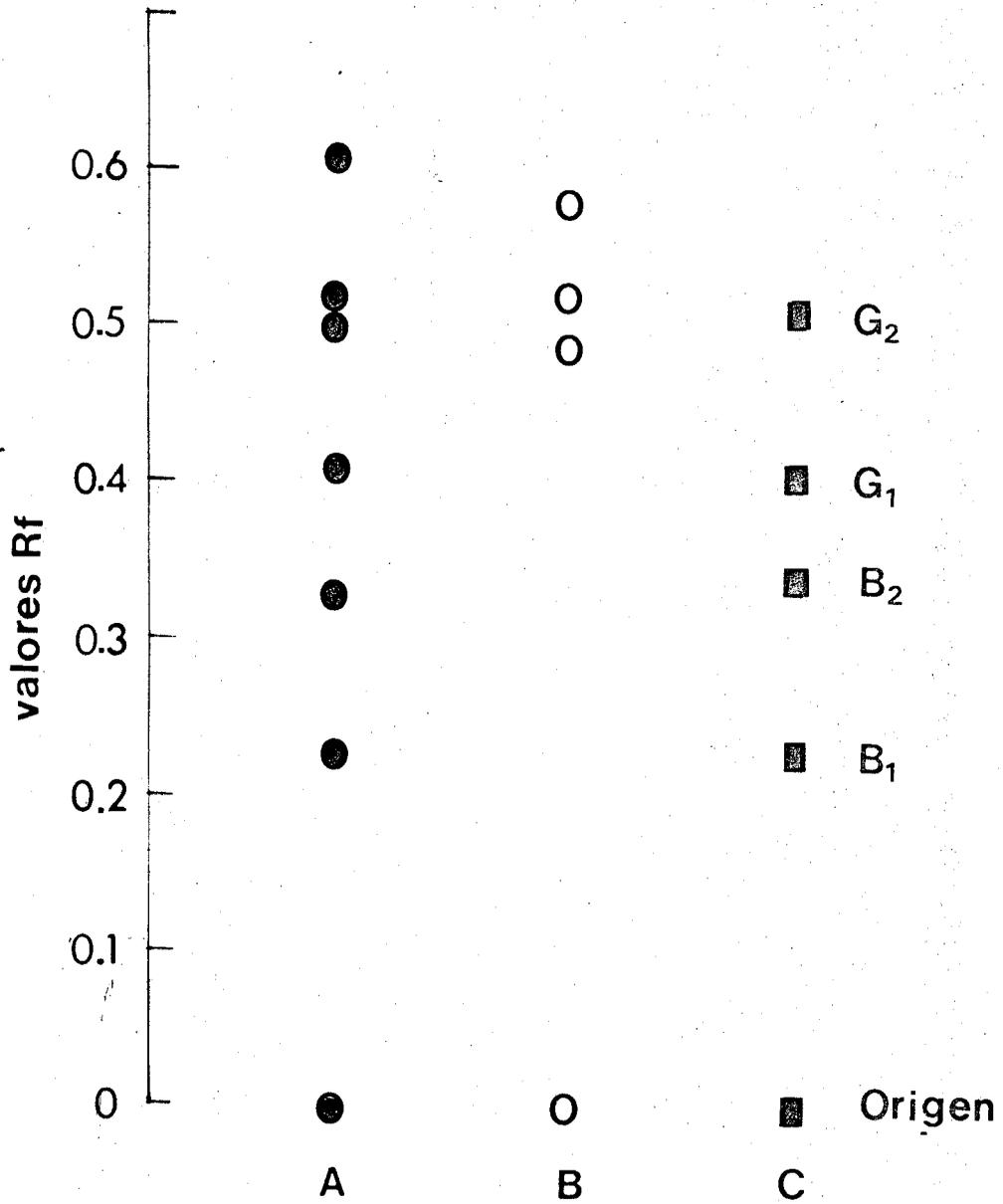


Fig. 7. Valores Rf de las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de (A) Aspergillus parasiticus, (B) Aspergillus tamaraii y (C) estándar de aflatoxinas.

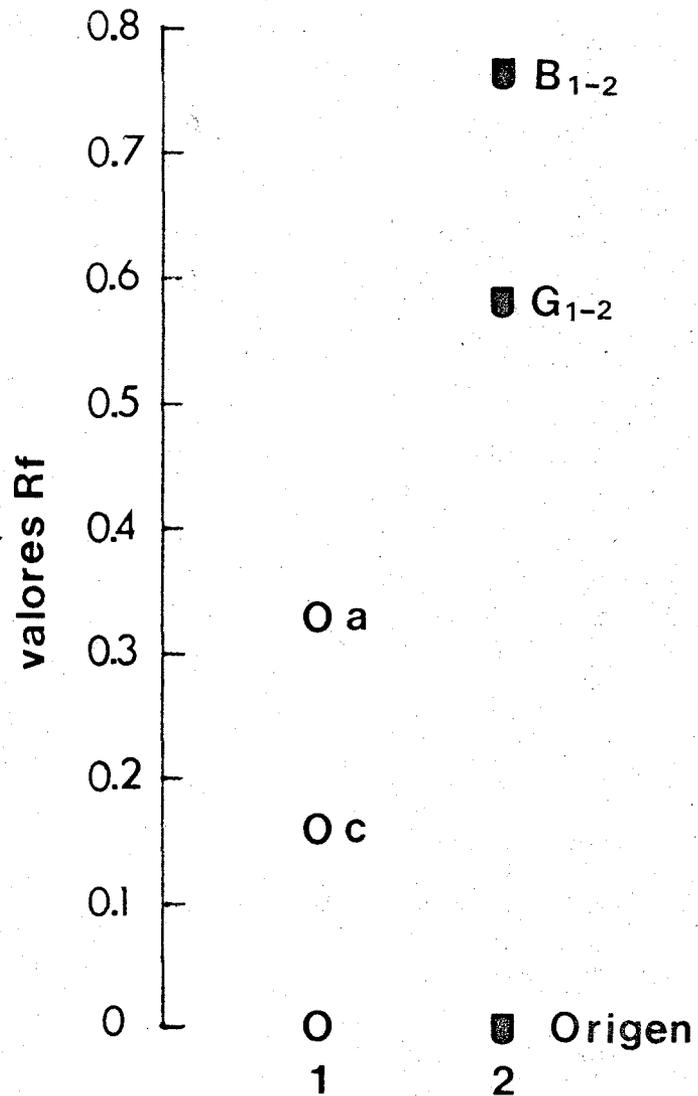


Fig. 8. Valores Rf de las bandas aisladas por cromatografía en capa delgada de gel de sílice G, obtenidas de los extractos de cultivos de 1) Aspergillus tamarii. El estándar de aflatoxinas se muestra en 2.

En el IR (Figs. 10 y 11) se observan bandas en:

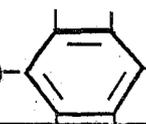
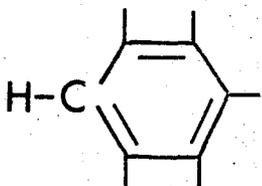
3300 cm^{-1}	-OH	
2920 cm^{-1}	-CH ₃	
1650 cm^{-1} 1630 cm^{-1}	>C=O (conjugado)	
1590 cm^{-1}	dobles enlaces aromáticos	
1400 cm^{-1} 1355 cm^{-1}	CH ₃ -O-	
1230 cm^{-1} 1140 cm^{-1} 1075 cm^{-1} 1040 cm^{-1}	C=O	C=O en CH ₃ -O- C=O _(h) en CH ₃ -O- 
940 cm^{-1} 862 cm^{-1} 770 cm^{-1}		

Fig. 9. Espectro de absorción de la banda "c" en la región ultravioleta (UV).

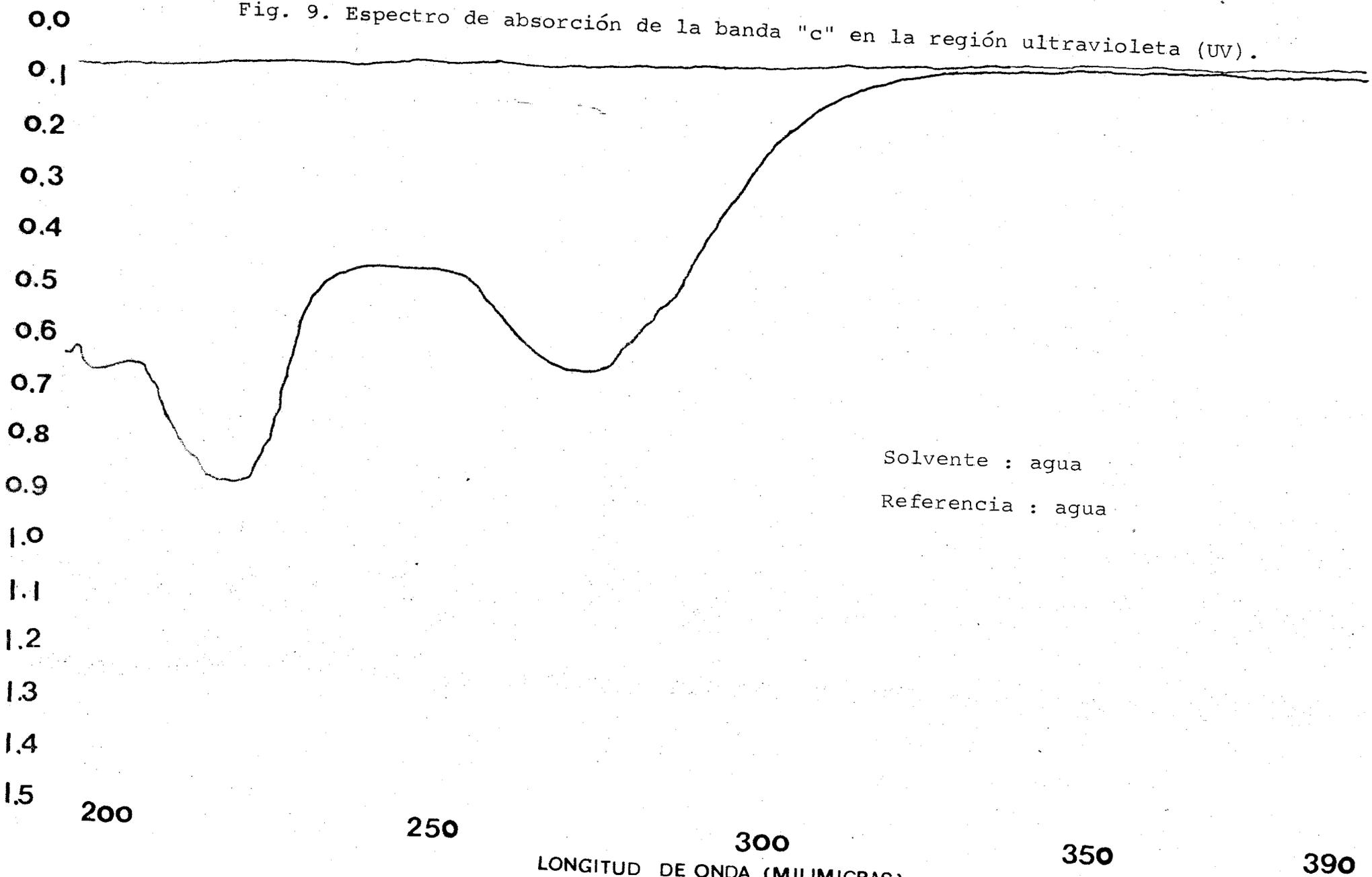


Fig. 10. Espectro de absorción de la banda "c" en el infrarrojo (IR).

Sólvente : K Br

Referencia : aire

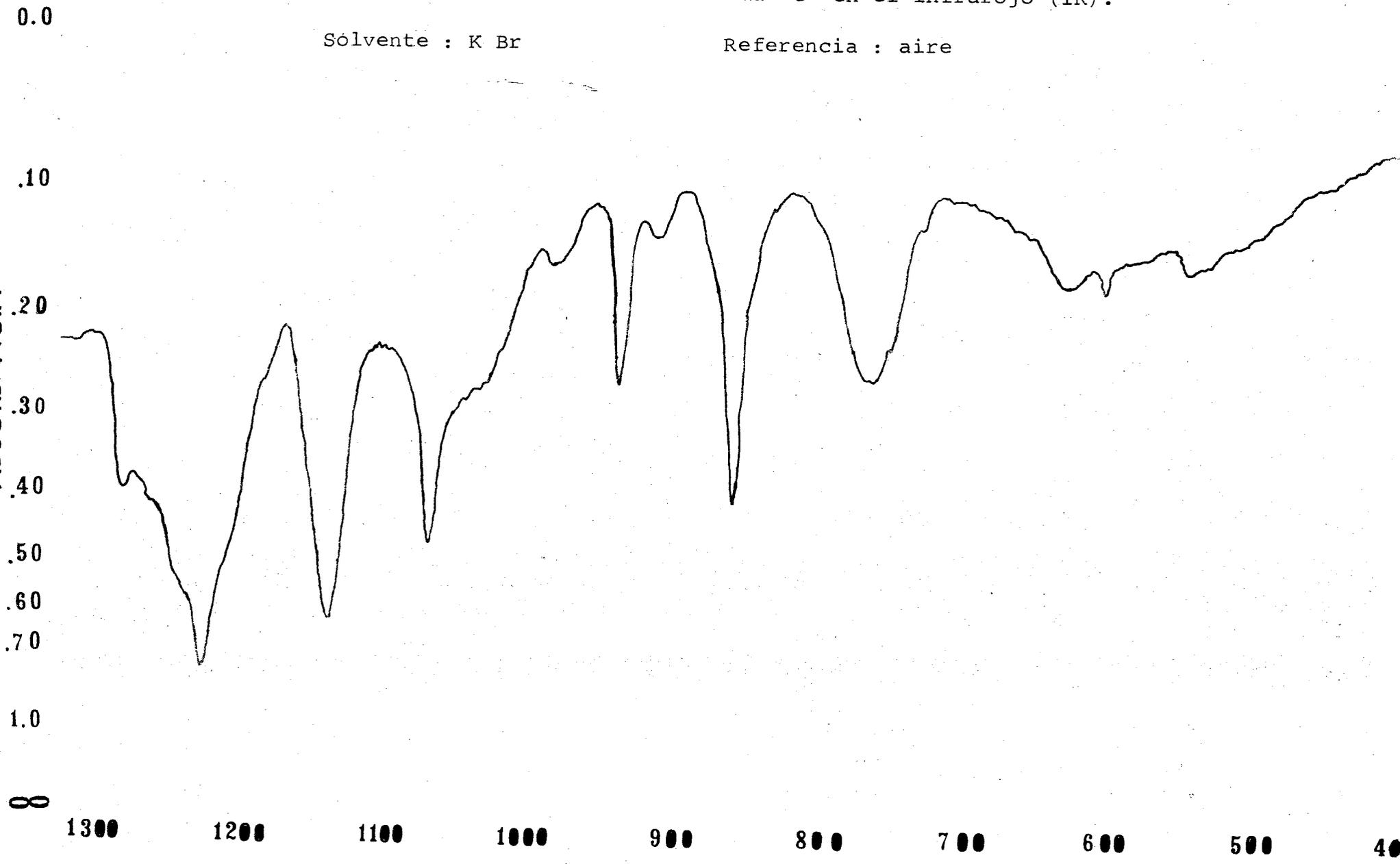
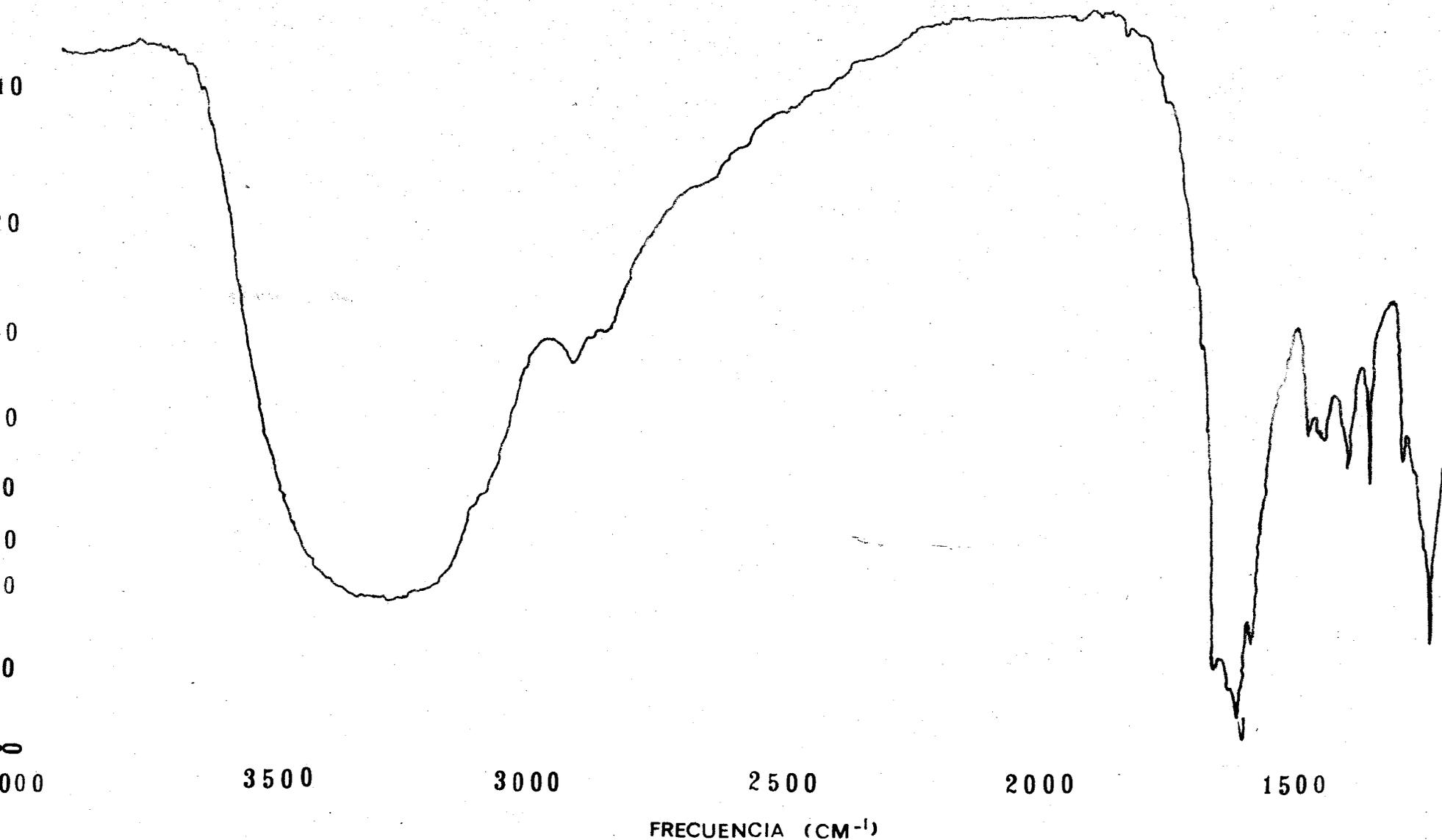


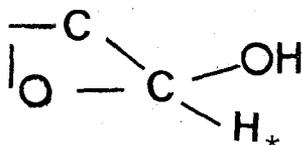
Fig. 11. Espectro de absorción de la banda "c" en el infrarrojo (IR).

Solvente : K Br

Referencia : aire



En RMN (Fig. 12) se observa una señal a 4.5 ppm correspondiente a $\text{CH}_3\text{-O-}$. En esta región se observa también una señal que localiza al protón base * del hemiacetal



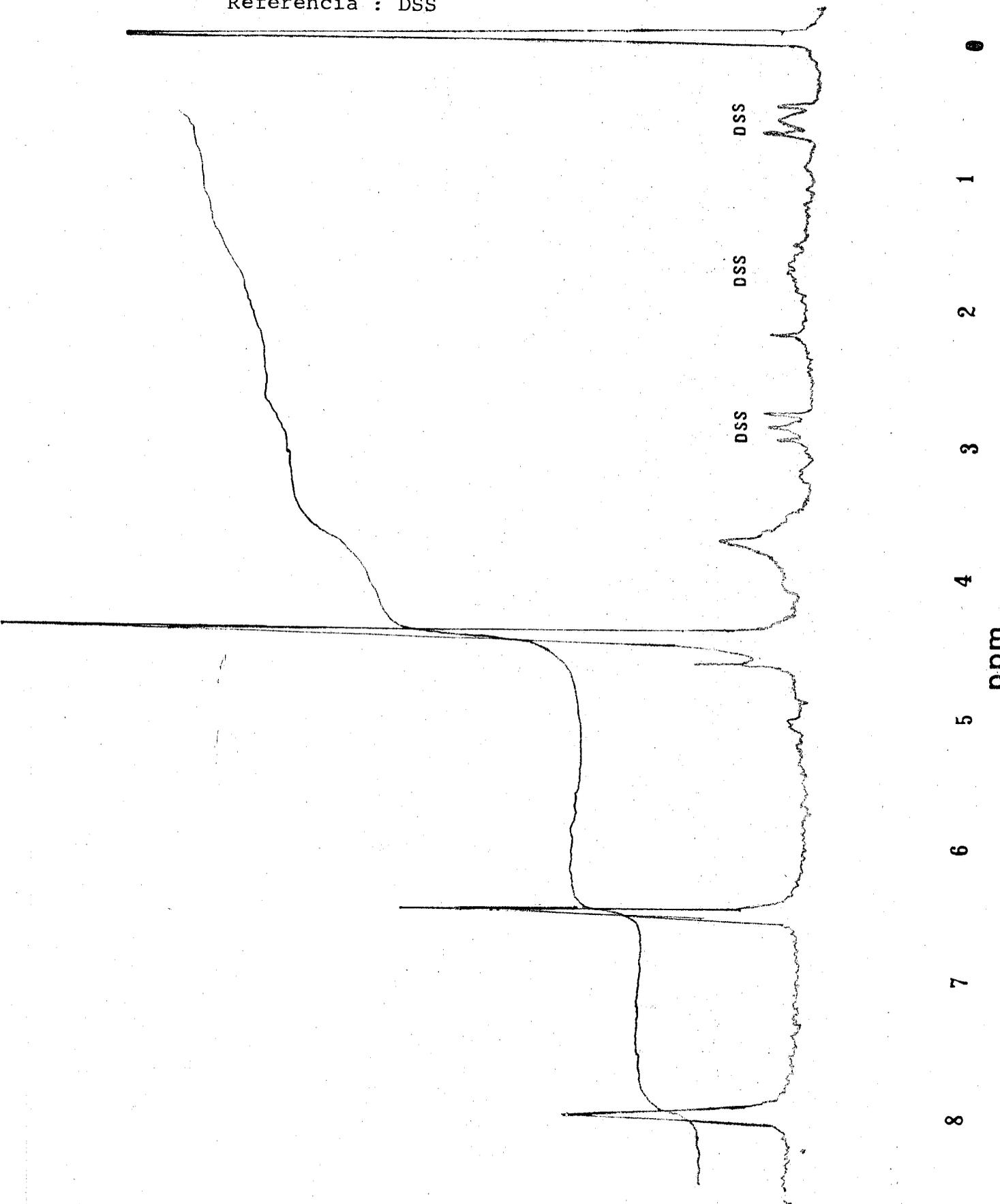
La señal en 8 ppm corresponde a los protones aromáticos y los protones bencílicos aparecen alrededor de 7 ppm. Tanto en el espectro de IR como en el de RMN se observaron bandas bien definidas que son características de compuestos puros.

En la figura 13 se muestra un resumen de las principales señales registradas por medio de estos análisis.

Por otro lado, cuatro diferentes elementos fueron encontrados en los cultivos infectados con esporas de A. parasiticus y de A. tamarii: linfocitos humanos con figuras mitóticas, micelio, estructuras conidiales y esporas del hongo correspondiente (Fig. 14). La frecuencia de estas estructuras se observó con una distribución al azar. En los cultivos testigos fueron registrados únicamente linfocitos y figuras mitóticas.

Fig. 12. Espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) de la banda "c".

Referencia : DSS



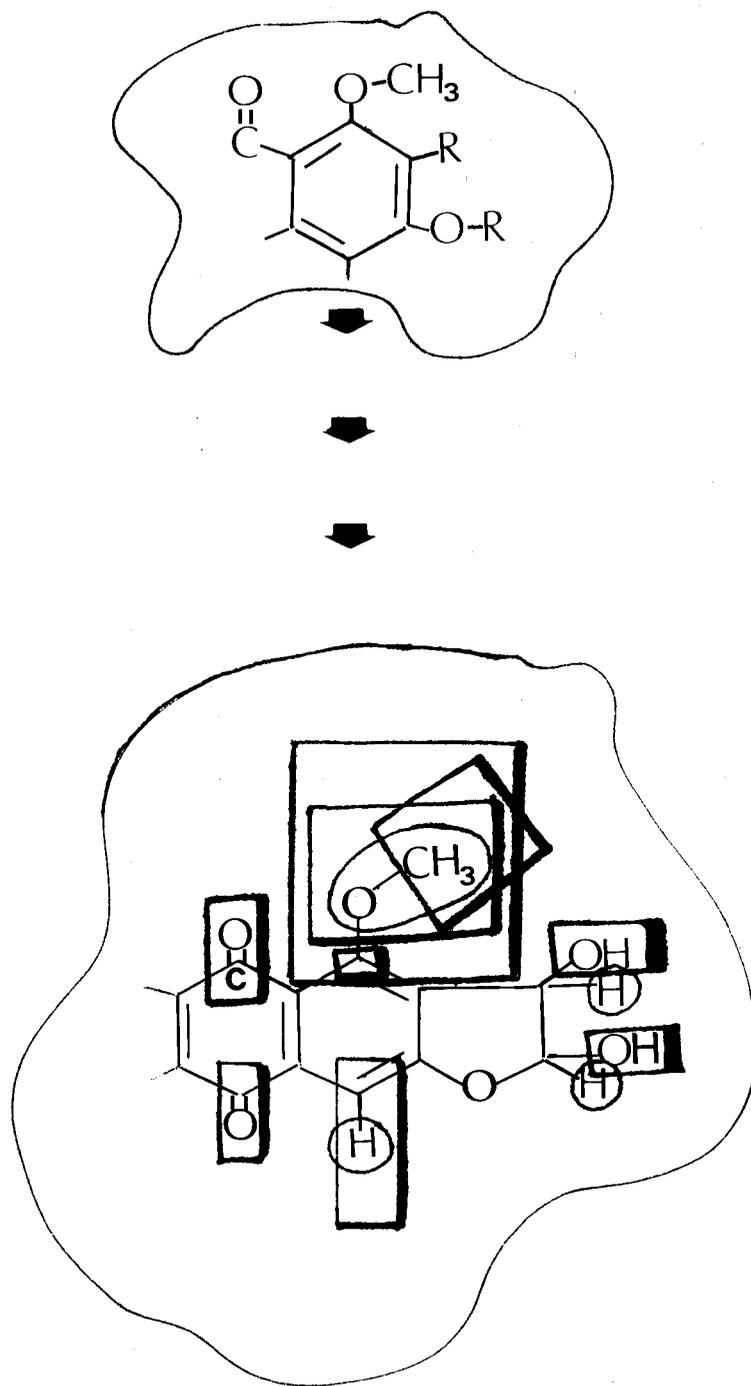


Fig. 13. Señales características emitidas en los espectros de UV (☆), IR (□) y RMN (○).

El efecto de la infección experimental con A. parasiticus produjo sobre la división celular un incremento del índice mitótico y en los cromosomas un aumento de la frecuencias de aberturas cromatídicas en relación con las obtenidas en los testigos (Tabla VI). Estos efectos fueron opuestos a los observados en los cultivos de linfocitos inoculados con esporas de A. tamarii en donde se encontró una marcada inhibición en el número de figuras mitóticas producidas y la ausencia de alteraciones cromosómicas (Tabla VII).

En la Tabla VIII se aprecia la distribución de 277 aberturas cromatídicas encontradas tanto en cromosomas identificados individualmente como en los identificados por grupo cromosómico; este análisis fue realizado sobre fotomicrografías de 50 células en metafase escogidas al azar en los cultivos tratados con A. parasiticus. Los porcentajes y el número total de aberturas cromatídicas en cada grupo cromosómico, así como el sitio de ruptura, se muestran en la Tabla IX; en la misma están incluidos el número total y el porcentaje de alteraciones en los brazos del cromosoma y en la región centromérica. La frecuencia de rompimientos situados en los brazos largos de los cromosomas fue mayor que en los cortos.

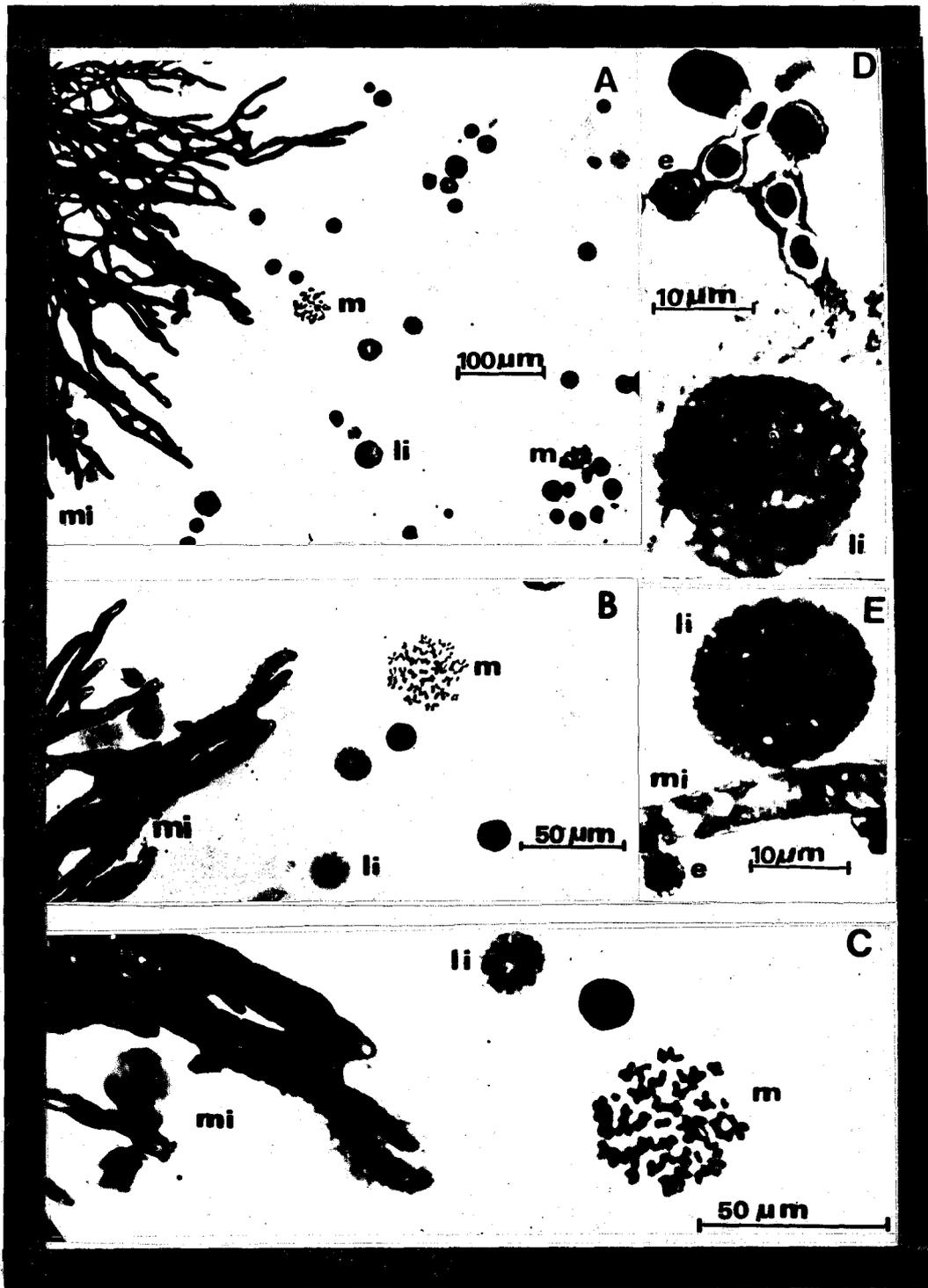


Fig. 14. Cultivos de linfocitos humanos inoculados con esporas de *A. parasiticus*. A, B y C, figuras mitóticas (m) de linfocitos humanos (li), micelio (mi). D y E, esporas (e) micelio (mi) y linfocitos (li).

TABLA VI

Efecto de la infección de Aspergillus parasiticus sobre linfocitos humanos en cultivo

	F i g u r a s m i t ó t i c a s						Indice mitótico %
	Analizadas		Sin daño		Dañadas		
	Total	%	Total	%	Total	%	
Testigos	1800	100	1770	98.3	30	1.7	1.88
<u>A. parasiticus</u>	2830	100	2510	88.7	320	11.3	4.50

TABLA VII

Indice mitótico en cultivos de linfocitos infectados con A. parasiticus (productor de aflatoxinas) y con A. tamarii (no productor)

	Indice mitótico	%
Testigos	1.88	100
<u>Aspergillus parasiticus</u>	4.50	239
<u>Aspergillus tamarii</u>	0.10	5

TABLA VIII

Distribución de 277 aberturas cromatídicas encontradas en los cultivos infectados con Aspergillus parasiticus, por identificación individual de los cromosomas (1 a 22) y por grupo ("A" a "G")

Grupo cromosómico	Cromosoma individual	Aberturas cromatídicas		
		Número	Total por grupo	% por grupo
"A"	1	23	62	22.4
	2	22		
	3	15		
	2*			
"B"	4	2	31	11.2
	5	5		
	24*			
"C"	6-X	9	116	41.9
	7	7		
	8	1		
	9	1		
	10	2		
	11	4		
	12	2		
90*				
"D"	13	2	37	13.4
	14	6		
	15	2		
	27*			
"E"	16	1	23	8.3
	17	5		
	18	1		
	16*			
"F"	19	0	1	0.4
	20	0		
	1*			
"G"	21	2	7	2.5
	22	0		
	5*			

* Cromosomas identificados por grupo únicamente.

TABLA IX

Distribución de aberturas cromatídicas por grupo cromosómico y por sitio de daño en los cultivos infectados con Aspergillus parasiticus

Grupo cromosómico	Brazo corto		Centrómero		Brazo largo		Por grupo	
	No.	%	No.	%	No.	%	Total	%
"A"	28	45.2	0	0	34	54.8	62	22.4
"B"	3	9.7	2	6.4	26	83.9	31	11.2
"C"	40	34.5	4	3.4	72	62.1	116	41.9
"D"	0	0	13	35.1	24	64.9	37	13.4
"E"	2	8.7	5	21.7	16	69.6	23	8.3
"F"	0	0	1	100	0	0	1	0.4
"G"	0	0	0	0	7	100	7	2.5
Total por sitio	73	26.4	25	9.0	179	64.6	277	100

Los daños situados en el centrómero mostraron una frecuencia menor que los observados en brazos largos y cortos.

La localización del daño observado en los cultivos tratados con A. parasiticus no fue la esperada, ya que la mayor cantidad de rompimientos se presentó en el grupo "C" y no en los grupos "A" y "B" como ha sido registrada por Cohen et al. (1967), y por Dolimpio et al. (1968), quienes emplearon LSD-25 y aflatoxinas, respectivamente (Tabla X). El número modal fue de 46 cromosomas y no se encontró afectado.

En la Tabla XI, aparecen algunos de los resultados obtenidos del análisis sobre los efectos producidos por los tres compuestos aislados de A. tamarii sobre linfocitos humanos en cultivo. La inhibición en el número de figuras producidas fue evaluada por medio de la comparación de los índices mitóticos obtenidos entre los cultivos tratados y los testigos. Estos resultados indicaron una actividad inhibitoria decreciente en orden "a" > "b" > "c" marcadamente significativa sobre este sistema. Mediante el análisis de los efectos producidos por dichas bandas sobre el porcentaje de

TABLA X

Distribución y prueba de χ^2 del daño cromosómico observado en cultivos de linfocitos infectados con Aspergillus parasiticus, comparada con el daño registrado utilizando LSD-25 y Aflatoxinas

Distribución del daño con base en la identificación individual de los cromosomas ("A"1, "A"2 y "A"3) o por grupo cromosómico ("B" a "G")

	"A1"	"A2"	"A3"	"B"	"C"	"D"	"E"	"F"	"G"	TOTAL
O	154.0	119.0	41.0	93.0	420.0	45.0	41.0	11.0	6.0	930.0
E	80.8	75.7	63.4	113.0	346.5	93.7	80.3	42.2	34.3	929.0
) ²]/E	66.2	24.8	7.9	3.5	15.6	25.3	19.2	23.1	23.1	209.0

$\chi^2 = 209.0$; $p < 0.001$, $df = 8$ (Cohen et al., 1967).

O	47.0	39.0	22.0	50.0	121.0	29.0	21.0	4.0	5.0	338.0
E	29.1	27.2	22.8	40.7	129.4	33.7	28.9	15.2	10.9	337.9
) ²]/E	11.0	5.1	0.03	2.1	0.5	0.7	2.1	8.3	3.1	32.9

$\chi^2 = 32.9$; $p < 0.0005$, $df = 8$ (Dolimpio et al., 1968).

O	23.0	22.0	17.0	31.0	116.0	37.0	23.0	1.0	7.0	277.0
E	23.8	22.3	18.7	33.3	106.1	27.6	23.7	12.5	8.9	276.6
) ²]/E	0.03	0	0.2	0.2	0.9	3.1	0.01	10.5	0.4	15.3

$\chi^2 = 15.3$; $0.10 > p > 0.05$, $df = 8$ (León y Aroche, 1977).

O = Daño observado.

E = El daño esperado por unidad de longitud del cromosoma se derivó de la multiplicación de los valores de longitud descritos en el sistema de clasificación de Denver en 1960, por el número de rupturas observado.

TABLA XI

Efecto de las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus tamarii sobre linfocitos humanos en cultivo

	Células analizadas	Índice mitótico	% de inhibición
Testigos	86117	0.53	-
Banda "a"	241168	0.24*	55
Banda "b"	123591	0.43*	19
Banda "c"	162350	0.48*	9.5

*

$P > 0.05$, con respecto a los testigos.

De acuerdo a la prueba de diferencia de proporciones (Spiegel, 1970).

cada figura mitótica (Tabla XII) se encontró que en relación con los testigos el número de profases (Fig. 16, B) se incrementó considerablemente en cultivos expuestos a las bandas "a" y "b", sin embargo, las anafases se encontraron inhibidas por "a" y "c" y las metafases marcadamente inhibidas por las tres. Es importante señalar que la banda "c" no incrementó el número de profases y la "b" no disminuyó el de anafases.

Diferencias entre los efectos de las bandas indican que en lo que se refiere a las metafases todas fueron significativamente diferentes, así como también en las profases. Estos resultados no se obtuvieron en el análisis de anafases, en el cual la banda "a" no mostró diferencias significativas respecto a "b" y "c", pero a la vez "b" y "c" sí fueron diferentes (Tabla XIII).

Por otro lado, para determinar el papel de los efectos clastogénicos sobre el efecto inhibitorio, se evaluó el nivel de toxicidad de cada banda con base en el significado estadístico del porcentaje de aberraciones cromosómicas registradas en estos cultivos (Tabla XIV).

TABLA XII

Porcentaje de figuras mitóticas en cultivos tratados con bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus tamarii

	Total de células analizadas	Profases		Metafases		Anafases	
		Total	%	Total	%	Total	%
Testigos	86117	8	0.01	466	0.52	6	0.007
Banda "a"	241168	68	0.03*	499	0.21*	5	0.002*
Banda "b"	123591	22	0.02*	500	0.40*	5	0.004
Banda "c"	162350	12	0.01	771	0.47*	2	0.001*

*

P > 0.05, con respecto a los testigos.

De acuerdo a la prueba de diferencia de proporciones (Spiegel, 1970).

TABLA XIII

Porcentaje de figuras mitóticas en cultivos tratados con bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus tamarii

	Total de células analizadas	Profases		Metafases		Anafases	
		Total	%	Total	%	Total	%
Banda "a"	241168	68	0.03*	499	0.21*	5	0.002
Banda "b"	123591	22	0.02*	500	0.40*	5	0.004**
Banda "c"	162350	12	0.01*	771	0.47*	2	0.001**

* $P > 0.05$, entre las bandas "a", "b" y "c".

** $P > 0.05$, entre las bandas "b" y "c".

De acuerdo a la prueba de diferencia de proporciones (Spiegel, 1970)

El análisis citogenético directo detectó efectos de dos tipos: aberturas cromatídicas (Fig. 15, B) y un efecto clasificado como ruptura múltiple de los cromosomas en sus cromátidas, o clasificado como una probable reduplicación cromosómica debido a que el número modal registrado se encontró en un rango de 90-92 cromosomas (Fig. 16, A). En relación con los testigos, el porcentaje de aberturas cromatídicas fue significativamente diferente en "b" ($P > 0.05$) y "a" ($P > 0.05$); sin embargo, "c" ($P < 0.05$) no presentó estas diferencias. El análisis entre las bandas registró que "a" no difiere de "b" y de "c", pero "b" y "c" ($P > 0.05$) tienen efectos diferentes (Tabla XV).

Con respecto a la probable reduplicación o rompimiento cromosómico en sus cromátidas, se encontró que además de que en los cultivos testigos no se registraron, no se obtuvieron diferencias significativas de tal efecto entre las bandas.

TABLA XIV

Análisis citogenético directo de cultivos de linfocitos tratados con las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus tamarii

	Total de metafases analizadas	Aberturas cromatídicas		Reduplicación cromosómica o cromátidas separadas	
		Total	%	Total	%
Testigos	446	6	1.33	-	-
Banda "a"	499	17	3.41*	7	1.4
Banda "b"	500	25	5.00*	14	2.8
Banda "c"	771	15	1.95	10	1.3

*

$P > 0.05$, con respecto a los testigos.

De acuerdo a la prueba de diferencia de proporciones (Spiegel, 1970).

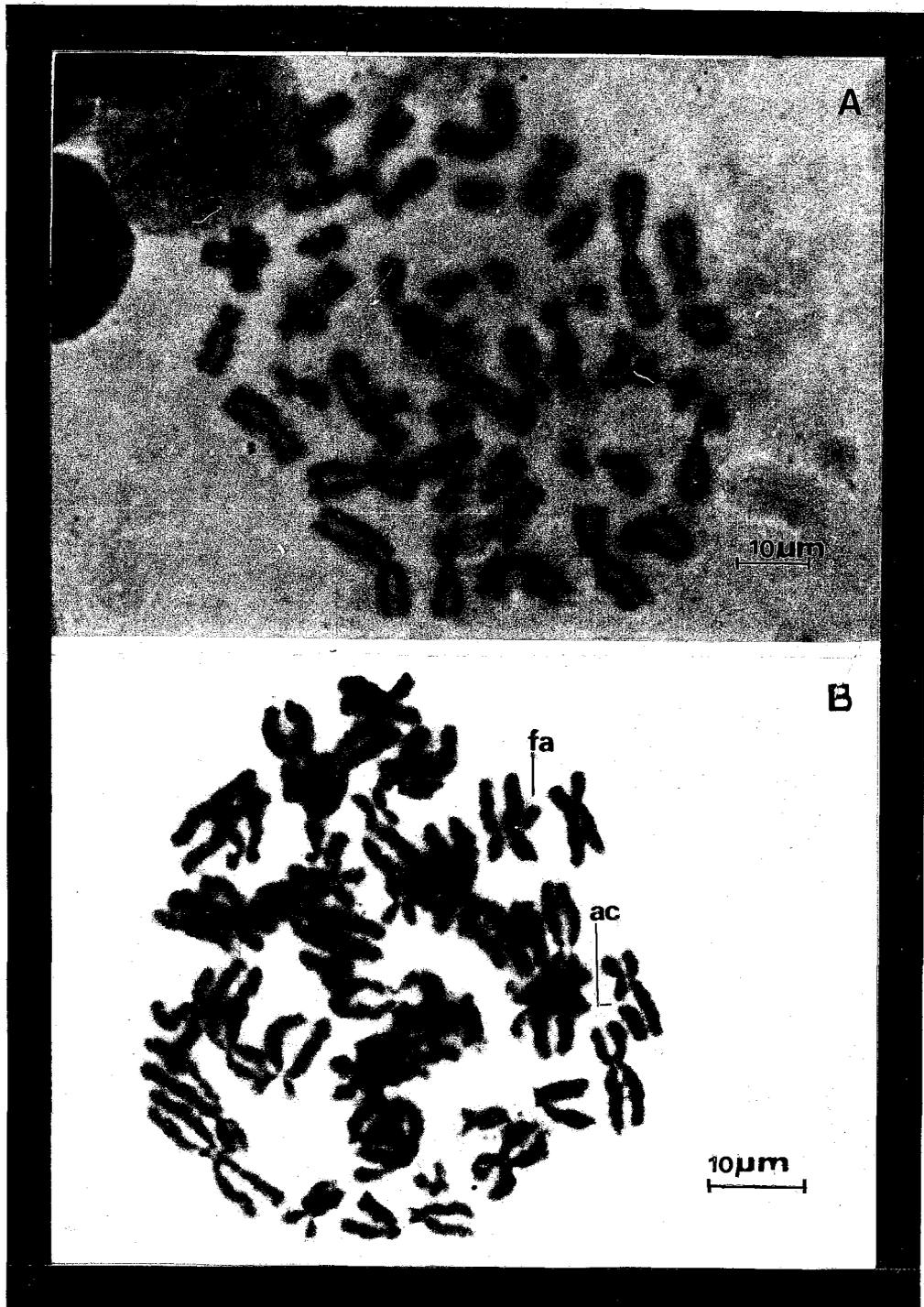


Fig. 15. Efectos clastogénicos observados en los -
cultivos inoculados con esporas de A. pa-
rasiticus o con las sustancias aisladas
por cromatografía de los extractos de cul-
tivos de A. tamaritii. A, cromosomas metafá-
sicos sin daño. B, efectos clastogénicos,
abertura cromatídica (a c) y fragmen-
to -
acéntrico (fa).

TABLA XV

Análisis citogenético directo de cultivos de linfocitos tratados con las bandas aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de Aspergillus tamarii

	Total de metafases analizadas	aberturas cromatídicas		Reduplicación cromosómica o cromátidas separadas	
		Total	%	Total	%
Banda "a"	499	17	3.41	7	1.4
Banda "b"	500	25	5.00*	14	2.8
Banda "c"	771	15	1.95*	10	1.3

*

P > 0.05, entre las bandas "b" y "c".

De acuerdo a la prueba de diferencia de proporciones (Spiegel, 1970).



Fig. 16. Cultivos de linfocitos humanos tratados con las substancias aisladas por cromatografía de los extractos de cultivos de A. tamaritii. A, cromátidas separadas o reduplicación. B, linfocito en estado de profase.

D I S C U S I O N

Las posibilidades de estimar diferencias en el comportamiento de los cultivos de linfocitos inoculados con una cepa productora de aflatoxinas y otra no productora podría sugerir que estas substancias son responsables en gran parte de la respuesta manifestada en esas condiciones; sin embargo, considerando la posibilidad de que A. parasiticus produjera además de las aflatoxinas otros metabolitos tales como los ácidos kójico y l-málico, parasitidina, aurantidina y parasiticol entre otros como lo han señalado algunos autores (Ba-sappa et al., 1970; Stubblefield et al., 1970), podría indicar que el daño observado sobre los cromosomas de los linfocitos pudiera deberse también a los efectos de la presencia de una mezcla de estos metabolitos y/o de otros producidos bajo las condiciones experimentales de este trabajo. Esta posibilidad podría a la vez explicar probablemente la escasa selectividad observada en la localización de las rupturas en los cromosomas largos de los grupos A, B y C (Tabla X). Comparando estos datos mediante el mismo procedimiento estadístico utilizado para observar dicha selectividad con aflatoxinas y otras substancias puras (Cohen et al., 1967; Dolimpio et al.,

1968), se podría suponer que los resultados obtenidos en este trabajo son probablemente una consecuencia del sinergismo entre varias moléculas, el cual podría afectar la proposición de que exista una relación directa entre la longitud del cromosoma y el grado del daño debido a la cantidad de ADN por cromosoma; asimismo, se podría suponer que tales efectos se relacionan directamente con el o los mecanismos de acción de dichos metabolitos, los cuales podrían indirectamente actuar sobre los cromosomas a través de la activación de las enzimas lisosomales debido a cambios en la permeabilidad de las membranas celulares, tal como sucede con diversos agentes que han sido probados por Allison y Paton (1965). Este mecanismo podría también explicar la estimulación antigénica responsable del incremento en el número de figuras mitóticas observado en los cultivos infectados con el hongo productor de las toxinas registradas en las cromatografías presentadas en este trabajo.

Por otro lado, la ausencia de aflatoxinas y la presencia de otros metabolitos no identificados encontrados en los cromatogramas de la cepa no productora, podría explicar la disminución, en relación a los testigos, en el número de

figuras mitóticas de los cultivos correspondientes; tal observación apoyaría la conclusión de que entre los metabolitos presentes, las aflatoxinas fueron en mayor grado las responsables del daño cromosómico registrado. Para lograr una mejor interpretación de estos resultados es necesario investigar los efectos de otras cepas no productoras de aflatoxinas sobre linfocitos en cultivo. Si tales efectos son semejantes a los observados al utilizar A. tamarii, este método podría ser un indicador para confirmar la presencia de micotoxinas y para registrar el grado de toxicidad de los hongos.

La metodología aquí empleada, ofrece posibilidades actualmente no sorprendidas que tienen relación con los estudios sobre las interacciones entre varios tipos celulares genéticamente diferentes, pero que en el sistema de prueba in vitro, parecen interactuar manifestando respuestas que en este estudio permitió observar poblaciones en pleno crecimiento de linfocitos de la sangre periférica en el mismo ambiente y al mismo tiempo con diversos tipos de hongos. En la literatura consultada se ha encontrado que, poblaciones de bacterias y sobrenadantes libres de células han sido recientemente colocados en similares condiciones (Meretoja y

Carlberg, 1977) para observar sus efectos sobre la actividad mitótica de linfocitos humanos; aunque en esos estudios y en otros (Petit y Unanue, 1974) se ha trabajado con diferentes poblaciones, todos coinciden en observaciones que hacen suponer que los compuestos puros utilizados en este sistema de prueba, tienen un efecto diferente al observado utilizando sistemas vivos productores de algunas sustancias o filtrados crudos de las mismas. Estas conclusiones podrían reforzar los cambios observados en los cultivos infectados con A. parasiticus respecto a los registrados en otros trabajos (Ong, 1975; Dolimpio et al., 1968) donde se utilizan aflatoxinas puras; sin embargo, con respecto a los resultados obtenidos mediante la infección experimental con A. tamarii, es interesante señalar la semejanza entre los niveles de inhibición mitótica encontrados en los cultivos experimentalmente infectados con el hongo (aproximadamente 95%) y los obtenidos por inoculación con las diferentes bandas aisladas de la misma especie (aproximadamente 85%).

Considerando que la pureza de las bandas registradas sobre cromatografía en papel fue confirmada, al menos

en la banda "c" por IR y RMN (Figs. 11 y 12), la similitud encontrada en los cultivos infectados y expuestos a las bandas sólo puede explicarse mediante la suposición de que la producción de estas sustancias por A. tamarii en los cultivos de linfocitos debió corresponder químicamente a las obtenidas mediante el crecimiento del hongo en un medio sintético, debido probablemente, a su capacidad fisiológica y genotípica de responder a un determinado medio ambiente, la cual puede ser diferente en A. parasiticus.

En este caso, los datos obtenidos en la inoculación de los compuestos aislados con el mismo sistema de cultivo sugieren y confirman que el método de la infección experimental es eficiente para obtener información acerca del efecto de las micotoxinas cuando éstas son producidas naturalmente en el medio ambiente del cultivo de linfocitos.

Actualmente se realizan estudios de este tipo conducidos para obtener una mejor valoración de la biología de algunos sistemas vivos y de las relaciones de estructura química y actividad de algunos compuestos producidos por éstos; tal es el caso de métodos estandarizados y sistemáticos para la detección de sustancias carcinogénicas en los

cuales se combinan los resultados de diversas pruebas biológicas como las realizadas en este trabajo, utilizando microorganismos, filtrados y sobrenadantes libres de células, cultivos celulares y animales de experimentación (Enomoto y Saito, 1972). La relativa eficiencia de los sistemas de este tipo, incluyendo las observaciones obtenidas utilizando A. parasiticus, A. tamarii y los compuestos producidos por éste, dependen en gran parte del tipo de molécula química de que se trate, del mecanismo de acción involucrado y de la estabilidad que se establezca en sus rangos de variabilidad metabólica secundaria.

Considerando que el tipo de molécula química está involucrada estrechamente con la actividad biológica observada en las bandas aisladas de A. tamarii, se plantea la necesidad de obtener una información completa acerca de la caracterización química de cada una de las bandas; sin embargo, en el presente estudio la interpretación de los resultados obtenidos permite concluir los siguientes puntos:

1. La acción inhibitoria en el número de figuras mitóticas fue el efecto preponderante de las tres bandas.

2. La asincronía en este tipo de métodos de cultivos celulares, permitió observar efectos en diferentes estados de la fase de mitosis.
3. El papel de los efectos clastogénicos permitió evaluar el nivel de toxicidad de cada banda y su relación probable con el efecto inhibitorio sobre la división celular.
4. El efecto inhibitorio sobre la división celular producido por la banda "a" puede relacionarse con el incremento del número de profases, la disminución del número de anafases, la reduplicación cromosómica observada en metafase y la significatividad en las aberturas cromatídicas observadas en los cultivos.
5. El efecto inhibitorio sobre la división celular producido por la banda "b" puede relacionarse con el incremento del número de profases, la reduplicación cromosómica observada en metafase y la significatividad en las aberturas cromatídicas observadas en estos cultivos.
6. El efecto inhibitorio sobre la división celular producido por la banda "c" puede relacionarse con la disminución del número de anafases y la reduplicación cromosómica

observada en la metafase de estos cultivos.

7. En los análisis realizados entre las bandas se observó una relación de actividad entre las bandas "a" y "c", que se presenta ausente entre "b" y "c".

Estas conclusiones indican que la caracterización de estos metabolitos como inhibidores de la división celular se relaciona con eventos que en los casos de las bandas "a" y "b" tienen que ver con efectos clastogénicos que ocurren particularmente durante la síntesis del ADN, período S o G₂ del ciclo celular, tal como sucede con las aflatoxinas (Promchainant et al., 1972). En la fase de mitosis, estas sustancias parecen afectar los procesos de la división celular, lo cual se expresa por el incremento del número de profases, la disminución de metafases y la probable reduplicación cromosómica observada en algunas metafases analizadas. Esto, además, indicaría que ambas inhiben el proceso mitótico en parte, al detener las células en la etapa de profase principalmente; sin embargo, considerando que los cultivos son asincrónicos, aquellas células que pudieran haberse encontrado en metafase no avanzaron a la anafase correspon-

diente, posiblemente por la acción de estas sustancias sobre el huso mitótico, lo cual pudo conducir en última instancia el pasaje de estas células por la interfase del ciclo celular a través del período S con replicación del ADN sin división celular. En este sentido es importante señalar que el establecimiento de los estudios de dosis-respuesta podrán incrementar la valoración de este efecto inhibitorio, sobretudo por la relación que pueden presentar las dosis utilizadas en la acción particular de cada una de las bandas; estudios colaterales podrán de igual manera confirmar si la reduplicación cromosómica observada es una consecuencia directa de alteraciones a nivel del centrómero y de las cromátidas. Similarmente, los estudios conducidos para la determinación de la interacción del mitostático y la sustancia mitogénica utilizadas comúnmente en los cultivos, con las bandas adicionadas a éstos, podrán ofrecer una mejor interpretación de estos resultados.

El significado de los efectos clastogénicos producidos por estas bandas, indican que el efecto inhibitorio sobre la división celular pudo deberse a la acción conjunta de efectos sobre la profase mitótica y daño cromosómico; sin em

bargo, debido a que la banda "a" fue la más inhibidora, con un incremento mayor del número de profases y con porcentaje menor de aberturas cromatídicas con respecto a "b", puede concluirse que tal efecto en la banda "a" pudo deberse principalmente a su acción sobre la profase, el cual en el caso de la "b" fue una consecuencia en mayor grado de los efectos clastogénicos.

En relación a la banda "c", el efecto inhibitorio observado parece haberse originado principalmente de su acción sobre la metafase y anafase mitóticas, debido a que no fue significativamente diferente a los testigos, en el número de profases observadas y en las aberturas cromatídicas registradas. La escasa diferencia significativa con los efectos de la banda "a", sugiere que posiblemente "c" y "a" presentan una estructura química parecida que pudiera estar relacionada con diferencias entre los radicales, los cuales pudieran a su vez inducir cambios importantes en los niveles de inhibición de la división celular, relacionados principalmente con las dosis óptimas a las cuales éstas actúan. Por otro lado, las diferencias observadas entre las bandas "b" y "c", sugieren que posiblemente ambas presentan diferencias mucho más marcadas en su estructura química debido

a la presencia de radicales que afectan los niveles anteriormente citados; sin embargo, "a" y "b" presentaron diferencias poco significativas entre ellas, por lo que estas relaciones de actividad entre las tres hacen pensar que se trata de compuestos parecidos entre sí con una estructura básica similar, como lo demuestran algunos de sus efectos, pero con diferencias probablemente en el tipo de radicales y sitio de colocación de éstos en el núcleo principal.

Por otra parte, se concluye tentativamente, que, con respecto a los resultados obtenidos en los estudios sobre la estructura química de la banda "c", del análisis espectroscópico se puede proponer la siguiente fórmula:

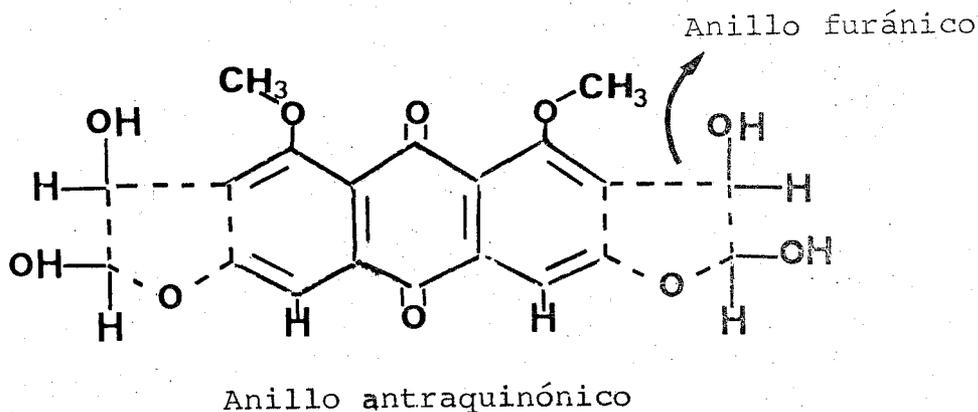


Fig. 17. Banda "c"

Esta sustancia podría considerarse como un producto de oxidación de una polihidroxi-antraquinona intermediaria en el esquema biogénico de las aflatoxinas. Tal intermedio presentaría ruptura en su molécula, los fragmentos procedentes de dos moléculas se reunirían y de este modo se produciría la banda "c" (Fig. 17 y 18).

El considerar la fórmula como un dímero del sistema cromofórico que se determinó en UV, se apoya en el hecho de tener un espectro de RMN simétrico. La señal de $\text{CH}_3\text{-O-}$ que está contiguo a un grupo C=O , tal como se señala en la fórmula tentativa, se encuentra muy desplazada, lo cual indica que la posición que se les asigna es la correcta. Así pues, se propone para este compuesto, la fórmula de un derivado antraquinóide cuya vía de síntesis podría ser la del empleo de productos de degradación de sustancias (versicol) que tienen la misma vía biosintética que las aflatoxinas (Wogan, 1975). El comportamiento cromatográfico de esta sustancia, corresponde al de un compuesto de elevada polaridad que nuevamente está de acuerdo con la fórmula propuesta.

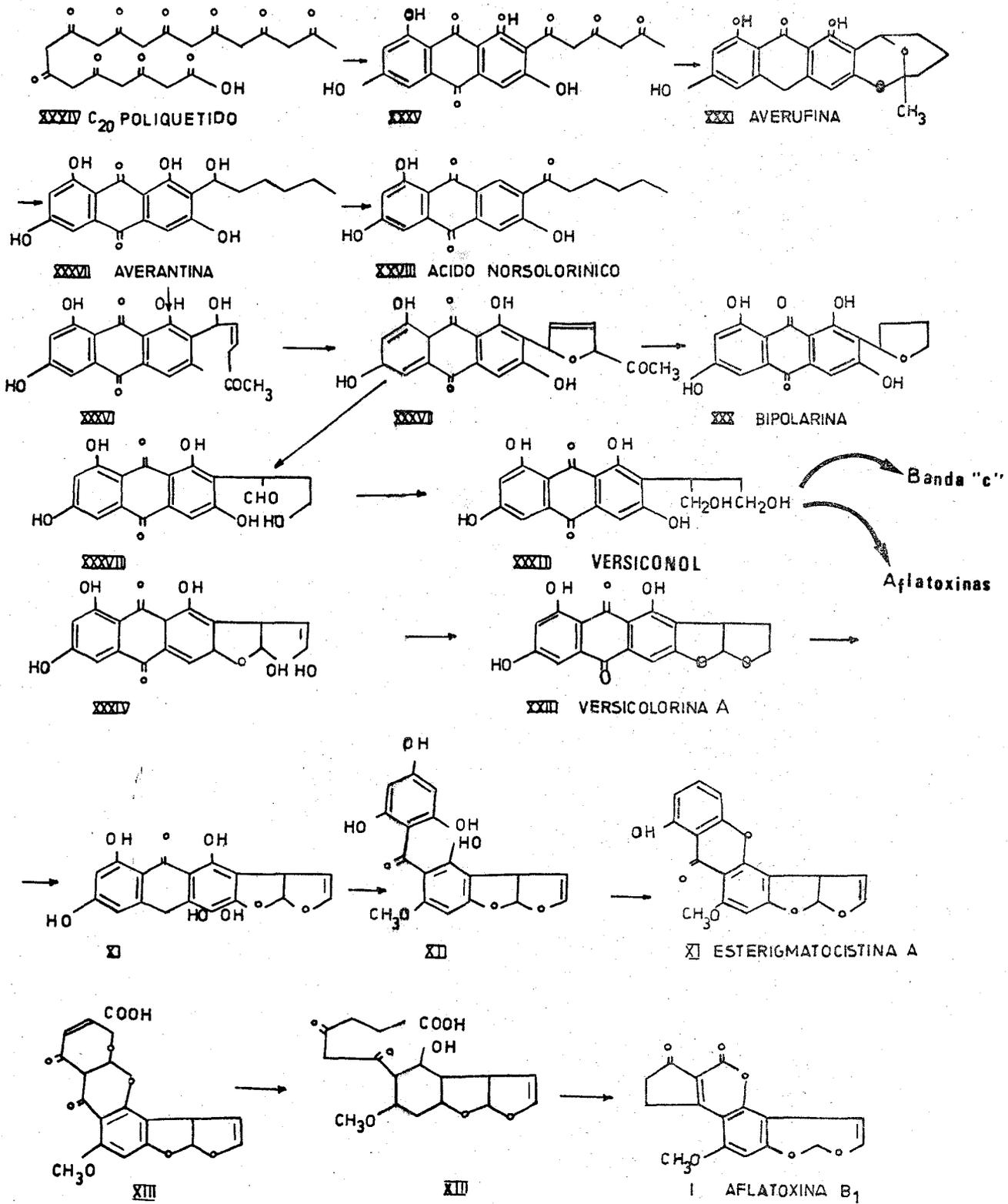


Fig. 18. Esquema biogenético de aflatoxinas y otros - metabolitos secundarios (Maggon *et al.*, 1977).

Es interesante hacer notar que en cepas mutantes para la producción de aflatoxinas, se han registrado la acumulación de productos intermediarios en el sistema biogénico de éstas. Estas observaciones sugieren un bloqueo en la biosíntesis de aflatoxinas, debido supuestamente a la pérdida de un sistema enzimático relacionado con la conversión de los respectivos intermediarios en sustancias del tipo de las aflatoxinas (Singh y Hsieh, 1977; Donkersloot et al., 1972). La acumulación de versiconol en el medio de cultivo de cepas de A. parasiticus expuestas a un inhibidor metabólico de esta biosíntesis, indicó el bloqueo de estas toxinas; aun más, fue posible recuperar nuevamente aflatoxinas cuando versiconol fue posteriormente adicionado a los cultivos no tratados con este inhibidor (Schroeder et al., 1974; Yao y Hsieh, 1974). En otros casos, el bloqueo de un intermediario produce una cadena de eventos bioquímicos que pueden conducir a la producción de un tipo de aflatoxina y presencia de otros productos acumulados que corresponden a sustancias intermediarias del tipo de la averufina, versiconol y versicolorinas (Maggon et al., 1977; Bennett et al., 1978).

Estas observaciones sugieren que en A. tamarisii posiblemente la acumulación de sustancias "a", "b" y "c".

corresponde a la presencia de productos de degradación de versiconol que aparentemente no funcionan como intermediarios en la biosíntesis de aflatoxinas. Esta suposición podría conducir a pensar que este hongo sí puede producir aflatoxinas potencialmente, como lo registran algunos autores (Lalithakumari y Govindaswami, 1970), sólo que en la mayoría de los casos la biosíntesis de tales compuestos se encuentra bloqueada. En este punto es importante considerar la necesidad de realizar estudios que permitan detectar los factores del medio que influyen sobre la variabilidad observada en la presencia de las bandas "a" y "b", sobre la presencia o ausencia de aflatoxinas y sobretodo, determinar la estructura química tentativa de las dos bandas aisladas de A. tamarii.

Con respecto a las relaciones de estructura y actividad biológica de la banda "c", únicamente se pueden suponer algunas características que tienen relación con las aflatoxinas; debido a que dicha discusión sólo podría estar fundamentada en relación con la estructura química y actividad de las bandas "a" y "b", las cuales se encuentran actualmente en preparación y no se discuten, las característi

cas más sobresalientes que presenta la banda "c" son la ausencia del núcleo cumarínico, la presencia de dos anillos furánicos separados por el anillo antraquinónico y la ausencia del doble enlace en los anillos furánicos.

De acuerdo con lo anterior, es importante considerar que en las aflatoxinas la ausencia del doble enlace del anillo terminal furano, como sucede en la B₂ y en la B_{2a} comparadas con la B₁ (Fig. 1), origina una significativa reducción en la potencia de toxicidad de esos compuestos. En la banda "c" no se observa tampoco este enlace, lo que podría indicar, junto con la presencia de radicales -OH, como sucede en las aflatoxinas B_{2a} y M₁ (Figs. 1 y 17), que esta molécula posiblemente presenta una disminución considerable en su potencia tóxica y carcinogénica, como se observó respecto a su toxicidad sobre los linfocitos en cultivo, con referencia en la ausencia de significatividad en el porcentaje de aberturas cromatídicas (Tabla XIV); así pues, el efecto inhibitorio de esta substancia sobre las metafases mitóticas podría encontrarse situado a nivel del anillo antraquinonide y en la presencia de radicales CH₃O- del mismo; aún así, la obtención de las estructuras químicas de las bandas

restantes podrá permitir la integración de estas observaciones, de tal modo que puedan conducirse aquellos experimentos que aclaren estas relaciones y proporcionen a la vez nuevos caminos en este tipo de investigaciones.

Es importante discutir que las quinonas se encuentran distribuidas ampliamente en la naturaleza y en los hongos se les localiza principalmente en el micelio en forma de antraquinonas, estrechamente relacionadas y mezcladas entre sí (Miller, 1961). Algunos de sus efectos es el que se refiere a su papel como antibióticos, Michaels y Schubert (1938) sugieren que en la mayoría de los casos se produce como una consecuencia de su acción sobre los procesos respiratorios, desacoplando la fosforilación oxidativa e inhibiendo ciertas cadenas respiratorias. En este sentido es importante hacer notar que sustancias inhibidoras de la fosforilación oxidativa, pueden bloquear el comienzo del proceso mitótico a causa de la ausencia del suministro energético, pero permanecen sin afectar la duplicación en el período S de la interfase; los cambios morfológicos consisten en la ausencia de fases mitóticas, pero con un aumento del volumen nuclear (De Robertis et al., 1975); sustancias que funcionan de este modo son clasificadas como sustancias que actúan en la profase y en menor

grado en la metafase mitóticas, tal como pudo ser detectado en los resultados obtenidos en el presente trabajo, no sólo con la banda "c" sino también con la "b" y la "a"; por consecuencia, sería importante considerar este mecanismo como una probable vía de acción de estas sustancias.

Considerando el aporte que pueda ofrecer la metodología utilizada en el presente trabajo en diferentes campos de la investigación, una apreciación más cercana de las conclusiones emitidas en éste, debe fundamentarse, en lo futuro, en la interpretación de resultados obtenidos de pruebas establecidas tanto en condiciones in vitro como in vivo. Debido a que las condiciones in vitro, pueden carecer en muchos casos de los mecanismos propios de transformación metabólica que hacen que algunas veces varíe la molécula originalmente establecida, produciéndose por consiguiente un derivado más o menos tóxico diferente al original, se incluyen actualmente en estos sistemas pruebas con moléculas previamente activadas en condiciones in vivo o in vitro (Coutiño, 1979). Especialmente en relación con este trabajo, se hace evidente la necesidad de activar metabólicamente las bandas "a", "b" y "c" y mediante la misma metodología aquí iniciada, obtener la confirmación del papel que juegan estas y otras

substancias como inhibidoras de la división celular. Una correlación de estos estudios con los realizados en condiciones in vivo no sólo incrementaría el potencial de la información obtenida, sino que también podría contribuir significativamente a la valoración de la metodología que se empleó, ya que mediante la utilización de otros métodos ha sido posible establecer en algunos metabolitos secundarios sus propiedades como antibióticos (Broadbent, 1966), insecticidas (Chinnici et al., 1976), etc., por medio de la metodología utilizada en el presente trabajo sería posible estudiar las propiedades de diversos metabolitos secundarios de origen fúngico, como las micotoxinas, desde el punto de vista de su caracterización como inhibidores de la división celular, sobretudo si esta propiedad adquiere un significado trascendente en estudios de correlación con pruebas in vivo, tal como sucede en algunas investigaciones relacionadas con la caracterización de la respuesta celular en diversos órganos de animales expuestos a extractos de micelios de Penicillium y de Aspergillus, en donde se observa un marcado incremento en las mitosis de células del hígado, sin cambios degenerativos celulares, por lo cual se sugiere que este efecto puede tener gran importancia como un indicador de la acción primaria

de las micotoxinas durante su formación (Enomoto y Saito, 1972), tal como probablemente sucedió en los cultivos infectados con A.parasiticus . En otros estudios, la correlación de los efectos de algunas sustancias sobre la inhibición de la división celular en la etapa de metafase, con los efectos producidos por éstas en animales y plantas, ha sido similarmente obtenida (Segawa et al., 1979). Datos adicionales sobre las relaciones entre la estructura química y actividad biológica de las micotoxinas, indican que las relaciones establecidas en condiciones in vitro concuerdan con las obtenidas in vivo (Maggon et al., 1977); en este sentido es necesario señalar que la reducción del doble enlace del anillo furánico en la banda "c", como sucede en algunas aflatoxinas, tiene relación con la ausencia de activación metabólica en pruebas in vivo. Debido a que el doble enlace en esta parte de la molécula es el sitio activo de la transformación en las aflatoxinas, esta característica química es una de las que se toman en consideración para explicar y fundamentar que en algunas micotoxinas las relaciones de estructura y actividad son equivalentes en dichas pruebas (Ong, 1975).

En el presente estudio la interpretación de los resultados obtenidos permite concluir, como lo sugieren al-

gunos autores (Brook y White, 1966; Enomoto y Saito, 1972), que en pruebas in vitro como las utilizadas en este trabajo, es posible determinar la capacidad de hongos aislados de alimentos para producir micotoxinas conocidas o desconocidas y caracterizar las respuestas de las células que interactúan en un mismo ambiente con hongos, filtrado del cultivo, extracto del micelio y de sustancias aisladas de estos hongos.

La evaluación de las respuestas manifestadas bajo esas condiciones indudablemente pueden proporcionar datos para la investigación sobre la observación de los efectos carcinogénicos, teratogénicos y mutagénicos que causan algunos de los muy diversos metabolitos secundarios originados en determinado género, especie o variedad de hongo sobre diferentes substratos y en diferentes condiciones; considerando estas variaciones, la correlación obtenida entre la infección experimental con A. tamarii y los efectos observados al utilizar las bandas aisladas de éste, pueden situar esta metodología como un sistema de análisis colateral a otros sistemas relacionados con la observación antes citada; sin embargo, se piensa que la característica más importante de este sistema es la posibilidad que pueda ofrecer al permitir

que con base en el análisis surja la inquietud de la búsqueda de otras propiedades que se encuentran directamente relacionadas con la estructura química, actividad biológica y que, además, sitúen la identificación de nuevas micotoxinas, como en este caso, dentro de la categoría de los compuestos que no son siempre una desventaja para los seres vivos.

R E S U M E N

Cultivos de linfocitos humanos fueron incubados durante 72 horas a 37°C con esporas de Aspergillus parasiticus Speare (cepa productora de aflatoxinas, NRRL 2999), o con esporas de Aspergillus tamaraii Kita (cepa no productora de aflatoxinas, NRRL 429). La presencia del hongo - productor de aflatoxinas en los cultivos de linfocitos - produjo efectos clastogénicos y el índice mitótico mostró un incremento en el número de figuras mitóticas comparado con aquellos infectados con el hongo no productor, o con los testigos. Sin embargo, la presencia del hongo no productor de aflatoxinas en los cultivos de linfocitos, causó una inhibición en la producción de figuras mitóticas - evaluadas por comparación del índice mitótico entre los - cultivos testigos y los infectados con A. parasiticus.

La evaluación de estos efectos permitió concluir que, al menos por 72 horas, los linfocitos y el hongo pueden interactuar en el mismo ambiente y los metabolitos sintetizados por los hongos, incluyendo aflatoxinas, pueden ser responsables de estos efectos.

La comparación cromatográfica entre los metabolitos presentes en los extractos de cultivos de estos hongos, y del estándar de aflatoxinas, registró diferencias químicas entre estas sustancias. A. tamarii produjo 3 diferentes bandas que no fueron identificadas como aflatoxinas: "a" con un valor Rf de 0.48 y fluorescencia azul; "b" con un valor de Rf de 0.52 y fluorescencia amarilla y "c" con un valor Rf de 0.58 y fluorescencia verde. Con el objeto de conocer el papel de cada una de estas bandas sobre la inhibición de los procesos mitóticos observados mediante la infección experimental inducida con A. tamarii, se procedió a investigar sus efectos sobre cultivos de linfocitos humanos. Mediante la evaluación del índice mitótico registrado en los cultivos tratados con estas sustancias, se encontró que las 3 bandas produjeron inhibición de algunos de los procesos mitóticos y mediante el análisis citogenético directo se registraron diferencias en sus efectos clastogénicos. Estos resultados permitieron concluir que las 3 bandas fueron responsables de la inhibición mitótica producida en los cultivos inoculados con A. tamarii.

Se discute la importancia de la relación entre la estructura química y la actividad biológica de estas - substancias y en relación con la banda "c" se propone una estructura química tentativa que pudo ser correlacionada con su actividad biológica,

Finalmente, se concluye que, la infección experimental inducida con estos hongos es un método adecuado para confirmar la presencia de micotoxinas y para investigar el grado de toxicidad de diversos hongos.

LITERATURA CITADA

- Aleksandrowicz, J. y B. Smyk, 1971. Mycotoxins and their role in oncogenesis, with special reference to blood disease. Pol. Med. Sci. Hist. Bull. 14: 25-30.
- Allison, A. C. y G. R. Paton, 1965. Chromosome damage in human diploid cells following activation of lysosomal enzymes. Nature 207: 1170-1173.
- Arakaki, D. T. y R. S. Sparkes, 1963. Microtechnique for culturing leulocytes from whole blood. Cytogenetics 2:57-60.
- Aroche, R. M., 1973. Efecto de toxinas de Aspergillus parasiticus Speare, sobre linfocitos humanos en cultivo. Tesis profesional. Fac. Ciencias, Univ. Nal. Autón. México, 47 p.
- Basappa, S. C., V. Sreenivasamurthy y H. A. B. Parpia, 1970. Aflatoxin and kojic acid production by resting cells of Aspergillus flavus Link. J. Gen. Microbiol. 6:81-86.

Bennett, J. W., F. A. Fernholz y L. S. Lee, 1978. Effect of light on aflatoxins, anthraquinones, and sclerotia in Aspergillus flavus and A. parasiticus. Mycologia 70:104-116.

Broadbent, D., 1966. Antibiotics produced by fungi. The Bot. Rev. 32:219-242.

Brook, P. J. y E. P. White, 1966. Fungus toxins affecting mammals. Ann. Rev. Phytopathol. 4:171-194.

Brown, R. F., 1970. Some bioassay methods for mycotoxins, p. 12-18. In M. Herzberg (ed.), Proceedings of the first U. S - Japan Conference on Toxic Microorganism. U. S. Dept of the Interior, Washington, D. C.

Büchi, G. H., P. M. Müller, B. D. Roebuck y G. N. Wogan, 1974. Aflatoxin Q₁ : A major metabolite of aflatoxin B₁ produced by human liver. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 8:585-592.

Bu'Lock, J. D., 1975. Secondary metabolism in fungi and its relationship to grow and development, p. 35-58. In J. E. Smith y D. R. Berry (ed.), The filamentous fungi, vol. 1, Industrial mycology. Edward Arnold Press, Londres.

Butler, W. H., 1975. Mycotoxins, p. 320-329. In J. E. Smith y D. R. Berry (ed.), The filamentous fungi, vol. 1, Industrial mycology. Edward Arnold Press, Londres.

Chinnici, J. P., M. A. Booker y G. C. Llewellyn, 1976. Effect of aflatoxin B₁ on viability, growth, fertility, and crossing over in Drosophila melanogaster (Diptera). J. Invertebr. Pathol. 27:255-258.

Christensen, C. M. (ed.), 1975. Molds, Mushrooms and Mycotoxins. Univ. Minn. Press, Minneapolis, Minn., 264 p.

Cohen, M. M., K. Hirshhorn y W. A. Frosch, 1967. In vivo and in vitro chromosomal damage induced by LSD-25. N. Engl. J. Med. 277:1043-1049.

Coutiño, R. R., 1979. Análisis de anafases en células en cultivo: Un sistema adecuado para la distinción de compuestos que alteran selectivamente la estructura cromosómica o el aparato mitótico. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímica). Fac. Química, Univ. Nal. Autón. México, 34 p.

Dalezios, J., G. N. Wogan y S. M. Weinreb, 1971. Aflatoxin P₁ : A new aflatoxin metabolite in monkeys. Science 171:584-585.

Davis, N. D., A. W. Hayes, D. W. Eldrige y U. L. Diener, 1966. Note on the isolation and purification of aqueous solutions of aflatoxins from fermentation medium. J. Ass. off. analyt. Chem. 49: 1224-1225.

Davis, N. D. y U. L. Diener, 1970. Environmental factors affecting the production of aflatoxin, p. 43-47. In M. Herzberg (ed.), Proceedings of the first U.S.-Japan Conference on Toxic Microorganism. U. S. Dept. of the Interior, Washington, D. C.

De Robertis, E. D. P., F. A. Saez y E. M. F. De Robertis
(eds.), 1975. Cell Biology. W. B. Saunders Co.,
Londres, 615 p.

Denver International Study Group, 1960. A proposed standard
system of nomenclature of human mitotic
chromosomes. Denver, Colorado, Addendum I.
Acta Genet 10:322-328.

Dolimpio, D. A., M. Legator y C. Jacobson, 1968. Effect of
aflatoxin on human leukocytes. Proc. Soc. Exp.
Biol. Med. 127:559-562.

Donkersloot, J. A., R. I. Mateles y S. S. Yang, 1972.
Isolation of averufin from a mutant of Aspergillus
parasiticus impaired in aflatoxin biosynthesis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 47:1051-1055.

Ellis, J. y J. A. DiPaolo, 1967. Aflatoxin B₁: Induction
of malformations. Arch. Pathol. 83:53-57.

Enomoto, M. y M. Saito, 1972. Carcinogens produced in fungi.
Annu. Rev. Microbiol. 26:279-312.

- Evans, H. J. y M. L. O'Riordan, 1975. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. Mutat. Res. 31: 135-148.
- Fishbein, L. y H. L. Falk, 1970. Chromatography of mold metabolites. I, Aflatoxins, ochratoxins and related compounds. Chromatogr. Rev. 12:42-87.
- Garner, R. C., E. C. Miller y J. A. Miller, 1972. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B₁ to a reactive derivative toxic to Salmonella typhimurium TA 1530. Cancer. Res. 32:2058-2066.
- Garner, R. C., 1973. Chemical evidence for the formation of a reactive aflatoxin B₁ metabolite, by hamster liver microsome. FEBS Lett. 36:261-264.
- Goldblatt, L. A., 1970. Objective determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ by fluorodensitometry, p. 30-35. In M. Herzberg (ed.), Proceedings of the first U.S.-Japan Conference on Toxic Microorganism. U. S. Dept. of the Interior, Washington, D. C.

- Heddle, J. A., 1969. Radiation-induced chromosome aberrations in man: A possible biological dosimeter. Fed. Proc. 28:1790-1793.
- Jemmali, M., J. Poisson y A. Guilbot, 1969. Production d' aflatoxines dans les produits céréaliers. Influence de différentes conditions. Ann. Nutr. Aliment. 23:151-166.
- Lalithakumari, D. y C. V. Govindaswami, 1970. Role of aflatoxins in groundnut seed spoilage. Curr. Sci. 39: 308-309.
- Legator, M. S. y W. G., Flamm, 1973. Environmental mutagenesis and repair. Annu. Rev. Biochem. 42:683-708.
- León, J. M. y R. M., Aroche, 1977. Effects of fungus Aspergillus parasiticus toxins on the chromosomes of human lymphocytes in vitro. Toxicon 15: 489-496.
- León, J. M., R. M., Aroche y C. B., Cuetos, 1978. Effects of several mycotoxins on the chromosomes on human lymphocytes in vitro, p. 759-765. In P. Rosenberg (ed.), Proceedings of the fifth

International Symposium on Toxins: Animal, plant and microbiol. Pergamon Press, Oxford y New York.

Lilly, L. J., 1965. Induction of chromosome aberrations by aflatoxin. Nature 207:433-434.

Maggon, K. K., S. K. Gupta y T. A. Venkitasubramanian, 1977. Biosynthesis of Aflatoxins. Bacteriol. Rev. 41:822-855.

Manabe, M., S. Matsura y M. Nakano, 1970. Isolation and quantitative analysis of four aflatoxins by thin-layer and liquid chromatography, p. 23-29. In M. Herzberg (ed.), Proceedings of the first U. S.-Japan Conference on Toxic Microorganism. U. S. Dep. of the Interior, Washington, D. C.

Masri, M. S., W. F. Haddon, R. E. Lundin y D. P.H. Hsieh, 1974. Aflatoxin Q₁. A newly identified major metabolite of aflatoxin B₁ in monkey liver. J. Agric. Food. Chem. 22:512-515.

- Meretoja, T. y G., Carlberg, 1977. The effect of Bacillus thuringiensis and cell-free supernatans of some other bacteria on the mitotic activity of human lymphocytes. FEMS Microbiol. Lett. 2:109-111.
- Michaels, L. y M. P. Schubert, 1938. The theory of reversible two step oxidation involving free radicals. Chem. Rev. 22:437-440.
- Miller, M. W., 1961. The Pfizer Handbook of microbial metabolites. Mc Graw-Hill, New York. 772 p.
- Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips y D. A. Hungerford, 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell. Res. 20:613-616.
- Moreau, C., M. Moreau y J. Pelhate, 1965. Comportement cultural de moisissures du blé en relation avec leur écologie sur grains. C. R. Acad. Sci. 255: 1229-1231.
- Moreau, C., 1974. Moisissures toxiques dans l'alimentation. Ed. Masson et Cie. Editeurs, Paris, 471 p.

Newberne, P.M., D. H. Harrington y G. N. Wogan, 1966.

Effects of cirrhosis and other liver insults on
induction of liver tumors by aflatoxin in rats.
Lab. Invest. 15:962-969.

Ong, T., 1975. Aflatoxin mutagenesis. Mutat. Res. 32:35-53.

Patterson, D. S. P., 1973. Metabolism as a factor in
determining the toxic action of aflatoxins in
different animal systems. Food Cosmet. Toxicol.
11:287-294.

Peters, R. H. y H. H. Sumner, 1953. Spectra of anthraquinone
derivatives. J. Chem. Soc. 2101-2110.

Petit, J. C. y E. R. Unanue, 1974. Effects of bacteriol
products on lymphocytes and macrophages:
Their possible role in natural resistance to
Listeria infection in mice. J. Immunol. 113:
984-992.

Promchainant, C., V. Baimai y A. Nondasuta, 1972. The
cytogenetic effects of aflatoxin and gamma-rays
on human leukocytes in vitro. Mutat. Res. 16:
373-380.

Raper, K. B. y D. I. Fennell, 1973. The genus Aspergillus.

Robert E. (ed.). Krieger Publishing Co. Inc.

Huntington, New York, 686 p.

Schroeder, H. W., R. J. Cole, R. D. Grigsby y H. Hein, Jr.,

1974. Inhibition of aflatoxin production and

tentative identification of an aflatoxin

intermediate "versiconal acetate" from

treatment with dichlorvos. Appl. Microbiol. 27:

394-399.

Scott, B., 1965. Toxigenic fungi isolated from cereal and

legume products. Mycopathol. Mycol. Appl. 25:

213-222.

Segawa, M., S. Nadamitsu, K. Kondo y I. Yoshizaki, 1979.

Chromosomal aberrations of Don lung cells of

Chinese hamster after exposure to vinblastine in

vitro. Mutat. Res. 66:99-102.

Shaw, M. W., 1970. Human chromosome damage by chemical

agents. Annu. Rev. Med. 21:409-432.

Singh, R. y D. P. H. Hsieh, 1977. Aflatoxin biosynthetic pathway elucidation by using blocked mutants of Aspergillus parasiticus. Arch. Biochem. Biophys. 178:285-292.

Smith, J. E., 1975. The structure and development of filamentous fungi, p. 1-15. In J. E. Smith y D. R. Berry (ed.), The filamentous fungi, vol. 1, Industrial mycology. Edward Arnold Press, Londres.

Spiegel, M. R., 1970. Estadística. Libros Mc Graw-Hill de México, S. A. de C. V., México, 357 p.

Stubblefield, R. D., O. L. Shotwell, G. M. Shannon, D.

Weislender y W, K. Rohwedder, 1970.

Parasiticol: A new metabolite from Aspergillus parasiticus. J. Agr. Food Chem. 18:391-393.

Swenson, D. H., E. C. Miller y J. A. Miller, 1974. Aflatoxin B₁-2,3-oxide: evidence for its formation in rat liver in vivo and by human liver microsomes in vitro. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:1036-1043.

Ulloa, M., y R. T., Hanlin, 1978. Atlas de Micología
Básica. Ed. Concepto, S. A., México, 158 p.

Wogan, G. N., 1973. Aflatoxin carcinogenesis. Methods
Cancer Res. 7:309-344.

Wogan, G. N., 1975. Mycotoxins. Annu. Rev. Pharmacol. 15:
437-451.

Yao, R. C. y D. P. H. Hsieh, 1974. Step of dichlorvos
inhibition in the pathway of aflatoxin
biosynthesis. Appl. Microbiol. 28:52-57.