



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE  
LA SALUD  
Y DE LA PRODUCCIÓN ANIMAL  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**EFFECTO DE LA FUMONISINA (FB1) Y DEOXINIVALENOL  
(DON) SOBRE LA MORFOLOGÍA Y EL CITOESQUELETO EN  
CULTIVO PRIMARIO DE EPITELIO INTESTINAL DE POLLO  
(Gallus gallus domesticus)**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**PRESENTA:  
SAÚL ESCOBEDO AGUIRRE**

**TUTORES:  
DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**DR. RUBÉN MERINO GUZMÁN  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, febrero 2024.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## DEDICATORIAS

*A ti, mamá, por ser mi apoyo moral y físico, siempre buscado lo mejor para mí.*

*A ti, papá, por siempre mostrarme el camino del trabajo y la dedicación, y por el apoyo brindado cada vez que lo necesité.*

*A ti, hermana, por mostrarme el camino académico de dedicación, esmero y constancia, y por el apoyo que siempre estuvo a mi alcance.*

*A ti, esposa, por acompañarme durante los días fáciles y difíciles, por estar siempre a mi lado.*

*A ti, Dr. Juan Carlos, por acompañarme en cada acción y palabra en este proyecto y por ser un gran amigo y guía tanto en la academia como en la vida.*

## AGRADECIMIENTOS

A la UNAM por permitirme estudiar y formarme como maestro en ciencias en la máxima casa de estudios, es un verdadero orgullo.

Al Dr. Juan Carlos Del Río García, que siendo mi tutor fue un apoyo siempre que lo necesité, por el aprendizaje brindado a lo largo del posgrado. Todo la formación profesional y enriquecimiento intelectual es gracias a ti, lo valoro y agradezco infinitamente.

Al Dr. Carlos Gerardo García Tovar por todas las enseñanzas prácticas y teóricas que adquirí en su laboratorio, por su amabilidad, por su trabajo realizado en este proyecto y por su enorme amabilidad al guiar este proyecto. Le agradezco su participación para hacer de este trabajo lo mejor.

Al Dr. Rubén Merino Guzmán por formar parte de mi comité tutorial y mostrarme otras maneras trabajar en este proyecto. Le agradezco su presencia y su paciencia a lo largo del posgrado.

Al MC Francisco González Díaz por toda su ayuda y apoyo brindado a lo largo del posgrado, su conocimiento fue invaluable y le agradezco todas las cosas que me enseñó acerca de los cultivos y cómo mantenerlos y estudiarlos.

A la cDra. Jacqueline Uribe Rivera por ser mi compañera y amiga durante este proyecto, el apoyo y la convivencia es algo que me llevo para toda la vida.

A la MVZ Rosalia Vigeras Moreno por brindarnos embriones durante el proyecto.

Gracias a los proyectos PAPIIT IN223320 y FESC UNAM CI2267 que hicieron posible este trabajo.

## RESUMEN

En México, la avicultura es una actividad esencial en la alimentación mexicana, representa más del 60% de la producción pecuaria nacional. En una producción pecuaria se utilizan materias primas libres de bacterias, hongos, contaminantes y tóxicos. Los hongos pueden producir compuestos tóxicos conocidos como micotoxinas, que representan un riesgo para la salud de humanos y animales. Las micotoxinas en los alimentos de origen animal pueden transferirse a humanos, siendo un riesgo directo a la salud pública. Se han implementado diversos modelos biológicos para evaluar el daño que causan las micotoxinas en animales, como los cultivos celulares que reducen el uso de animales para experimentación y ofrecen condiciones controladas para estudios específicos. En las células se presenta una estructura conocida como citoesqueleto conformado por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, con ellos, la célula define la posición y movimiento de los organelos y de vesículas así como la forma, polaridad y movimiento celular. Cuando los animales consumen alimento contaminado con micotoxinas, padecen problemas inmunitarios, reproductivos, oncogénicos, etc. A este desorden se le llama micotoxicosis. Algunas micotoxinas como la Ocratoxina A, la Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) y la Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) son capaces de producir varios efectos citotóxicos tanto en animales como en humanos. Tanto el DON como el FB<sub>1</sub> alteran las funciones de la barrera intestinal probados en cultivos celulares de riñón de mono y humanos, así como, en células intestinales de cerdo neonato (IPEC). Los objetivos de este trabajo fueron la evaluación del efecto de la fumonisina (FB<sub>1</sub>) y el Deoxinivalenol (DON) sobre la morfología celular y sobre el citoesqueleto en un cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo. Se obtuvieron cultivos primarios intestinales de embrión de pollo, una vez alcanzada la confluencia de 100% se añadió la FB<sub>1</sub> y el DON en concentraciones de 1.4 µM, 4.2 µM y 6.9 µM de FB<sub>1</sub>, y 1.7 µM, 3.4 µM y 10.1 µM de DON. El cultivo fue revisado y fotografiado a las 12, 24 y 48h para su evaluación morfológica y para identificar los filamentos de actina se utilizó la técnica de fluorescencia directa, con faloidina conjugada a rodamina como marcador y DAPI para marcar los núcleos. A las 24h, las células presentaron disminución de la confluencia celular, detritos celulares y forma alargada en dependencia de la concentración de las micotoxinas, siendo DON la toxina que más afectó a las células al presentarse una confluencia de 0% en concentración alta. A las 48h la confluencia es menor y la presencia de detritos celulares es mayor. El citoesqueleto de las células tratadas con FB<sub>1</sub> se observaron con una forma piramidal y una disminución en la confluencia. Las células tratadas con DON presentaron una forma alargada y delgada con disminución en la confluencia al evaluar su citoesqueleto. En el presente trabajo se estandarizó el cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo, se demostró el efecto citotóxico de FB<sub>1</sub> y DON en su morfología y citoesqueleto en relación a la concentración y tiempo de exposición, DON y FB<sub>1</sub> inhiben la presencia de lamelipodios y filopodios.

Palabras clave: *Cultivo celular primario, embrión de pollo, micotoxicosis, Fumonisina B1, Deoxinivalenol, morfología celular, citoesqueleto.*

## Tabla de contenido

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
Avicultura.....	1
Alimentación e inocuidad .....	1
Experimentación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	2
Cultivo primario.....	2
Citoesqueleto .....	3
Micotoxinas.....	4
Efecto de las micotoxinas en cultivos celulares .....	5
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>6</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>6</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>6</b>
1.- Diseño experimental.....	7
<b>METODOLOGÍA</b> .....	<b>8</b>
1.- Cultivo celular.....	8
2.- Toxina .....	11
3.- Morfología celular y estructura de los filamentos de actina.....	11
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>13</b>
Citoesqueleto .....	19
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>22</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>24</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>25</b>

# INTRODUCCIÓN

## Avicultura

La producción avícola ha sido una actividad consolidada durante siglos, evolucionando de una práctica artesanal a una altamente industrializada. La implementación de tecnologías avanzadas, prácticas de manejo científicamente respaldadas y sistemas de crianza optimizados ha llevado a un aumento significativo en la producción y disponibilidad de carne de ave y huevos. Esta evolución también ha tenido un impacto positivo en la reducción de la malnutrición, ya que las aves de corral ofrecen una fuente rica y accesible de nutrientes esenciales para las poblaciones en todo el mundo. Sin embargo, a medida que la producción avícola ha crecido, también han surgido desafíos que requieren abordarse de manera responsable. La intensificación de la producción puede plantear preocupaciones sobre el bienestar animal y la sostenibilidad ambiental. Es esencial implementar prácticas de manejo éticas que garanticen el bienestar de las aves y minimicen el impacto ambiental de la industria. La adopción de métodos de cría más sostenibles, el control de enfermedades y la gestión adecuada de los desechos son aspectos clave para garantizar la viabilidad a largo plazo de la producción avícola (Smith, 2018).

La avicultura es una de las principales actividades agroindustriales a nivel mundial, con un valor estimado de más de \$200 mil millones de dólares anuales (FAO, 2020).

En México, la avicultura representa más del 60% de la producción pecuaria nacional. Es una actividad que genera empleo y ha contribuido significativamente al desarrollo económico de regiones específicas del país. Esta actividad agroindustrial ha logrado establecerse como una fuerza motriz en la economía del país, generando empleo y desempeñando un papel vital en el desarrollo económico de varias regiones específicas. La producción avícola en México, centrada principalmente en la cría de pollos y gallinas ponedoras, ha experimentado un crecimiento constante debido a su eficiencia y capacidad para satisfacer la demanda de proteínas animales en el mercado interno. La versatilidad de la carne de pollo y los huevos como fuente de proteínas asequibles y de alta calidad ha contribuido a que la avicultura sea una actividad esencial en la alimentación de la población mexicana (SAGARPA, 2021).

## Alimentación e inocuidad

La alimentación es un pilar fundamental para el desarrollo y bienestar de los seres vivos. Un adecuado balance nutricional es esencial para garantizar una salud óptima (Johnson & Davis, 2019), así mismo, la inocuidad alimentaria es crucial para asegurar que los alimentos (granos, cereales, carne, huevo, etc.) no causen daño al consumidor al ser preparados y consumidos de acuerdo con su uso previsto (OMS, 2020). Es vital para proteger la salud pública y fomentar la confianza en los sistemas alimentarios. El éxito de una producción pecuaria radica en utilizar

materias primas de primera calidad y libre de bacterias, contaminantes y tóxicos, por lo que, la contaminación de alimentos, causada por hongos, es una preocupación mundial. Estos microorganismos pueden producir compuestos tóxicos conocidos como micotoxinas, que representan un riesgo para la salud de humanos y animales (Turner et al., 2017).

Las micotoxinas en los alimentos de origen animal pueden transferirse a humanos, representando un riesgo directo a la salud pública. El control y monitoreo de estas sustancias en la cadena alimentaria es esencial para garantizar la seguridad alimentaria (FAO/OMS, 2018).

### Experimentación *in vivo* e *in vitro*

Aunque la experimentación *in vivo* ha proporcionado numerosos avances, también presentan desafíos éticos y metodológicos, que impactan en el bienestar animal y los resultados del impacto en animales puede indicar el daño potencial que las micotoxinas tendrán en humanos (Brown & Bailey, 2020).

Se han implementado diversos modelos biológicos para evaluar el daño que causan las micotoxinas en animales. Uno de ellos son los cultivos celulares, los cuáles ofrecen una alternativa para reducir el uso de animales en la investigación, además de proporcionar condiciones controladas para estudios específicos (Martínez *et al.*, 2018). Otras ventajas del uso de cultivos celulares son: reproducibilidad, facilidad de manipulación, estudiar los mecanismos de lesión celular y moleculares (Lee & Kim, 2019, Fernández-Cruz *et al.*, 2020, Singh & Gupta, 2021).

### Cultivo primario

Cuando las células de un animal son removidas y mantenidas con vida bajo condiciones apropiadas se le llama cultivo celular. El uso de los cultivos celulares por parte de los investigadores ha sido una herramienta invaluable gracias a que facilita el análisis de los procesos biológicos que son de difícil acceso en un organismo intacto. Para mantener los cultivos celulares, primarios o inmortalizados, se requieren conocimientos y destrezas en técnicas esenciales (Helgason y Molinero, 2005 y Castaño, 2008).

Entre las mayores ventajas del uso de los cultivos celulares es la reproducibilidad para la obtención de resultados en los ámbitos de virología, biotecnología, biología molecular y biología celular. Dentro de los diferentes cultivos, el cultivo primario es aquel que se obtiene directamente a partir de tejidos animales, siendo una de las mejores opciones el uso de tejidos a partir de embriones por mostrar un mejor crecimiento, generalmente presentan un tiempo de vida limitado (Castaño, 2008).



## Citoesqueleto

En las células se presenta una estructura conocida como citoesqueleto, el cual es una red de proteínas fibrilares que pueden estar ancladas a la membrana celular o radiarla desde el centro de la célula a la periferia y viceversa (Salceda y Albert, 2017).

El citoesqueleto está conformado por filamentos de actina, microtúbulos y filamentos intermedios, con ellos, la célula define la posición y movimiento de los organelos y de vesículas así como la forma, polaridad y movimiento celular (Salceda y Albert, 2017).

Los filamentos de actina, presentes en todas las células eucariotas, están conformados por polímeros helicoidales de la proteína globular actina que se organizan en una variedad de haces paralelos unidireccionales, antiparalelos, y redes bidimensionales y tridimensionales para formar, entre otros componentes, el sistema contráctil muscular, la formación de microvellosidades epiteliales, la corteza celular, fibras de tensión y la formación de filopodios, lamelipodios y pseudópodos. Los filamentos de actina están concentrados debajo de la membrana plasmática para proveerle forma y movilidad de la superficie a la célula. También se asocian con otras proteínas, como la miosina, formando estructuras temporales, tal es el caso de la formación del anillo contráctil durante la replicación celular. Las funciones generales de los filamentos de actina es participar en dar la forma celular, movimientos (tanto intracelular como migración celular) y estado físico del citosol (Salceda y Albert, 2017).

Los microtúbulos están compuestos por la proteína tubulina, dispuesta de manera cilíndrica a través de 13 protofilamentos polarizados. Tienen la capacidad de polimerizarse y despolimerizarse en sus extremos positivos y negativos, respectivamente. Los microtúbulos se extienden a partir de los centrosomas hacia la periferia de la célula para formar una red de transporte celular de diferentes componentes como vesículas y organelos a través de diferentes proteínas que se asocian a los microtúbulos como las cinesinas y las dineínas (transporte en sentido positivo y negativo, es decir, hacia la periferia y hacia el centro de la célula, respectivamente). También forman estructuras estables como es el caso de los cilios y los flagelos. Las funciones generales de los microtúbulos es la organización intracelular y el transporte intracelular. (Salceda y Albert, 2017).

Los filamentos intermedios son proteínas que conforman una red alrededor del núcleo que se extiende hacia toda la célula por el citoplasma anclándose en desmosomas y al substrato en los hemidesmosomas. Gracias a su flexibilidad y su gran fuerza tensora, le proveen a la célula un soporte arquitectónico, permitiendo que la célula resista el estrés mecánico. Los filamentos intermedios forman redes transcelulares y sus funciones generales son dar fortaleza, resistencia y estabilidad a la célula (Salceda y Albert, 2017).

## Micotoxinas

Las micotoxinas son sustancias tóxicas producidas por algunas especies de hongos bajo ciertas condiciones. Los patrones climáticos, la integridad de la planta o del cereal, la presencia de insectos, la localización geográfica, etc, son factores que influyen la producción de micotoxinas, lo que impacta en la prevalencia de éstas. Las micotoxinas se pueden encontrar en varios tipos de suelos, incluso en plantas y cereales que son utilizados como ingredientes en la alimentación animal. Las micotoxinas comúnmente encontradas como contaminantes de los alimentos son Ocratoxina A, Tricotecenos, Deoxinivalenol, Fumonisin, Aflatoxinas y Zearalenona (Perusia y Rodríguez, 2001; Jouany *et al.*, 2009; Zain, 2011). La presencia de micotoxinas en los alimentos puede originarse debido a condiciones inapropiadas de almacenamiento, transporte o cultivo de los productos (Moss, 2018).

Las micotoxinas son clasificadas como metabolitos secundarios, lo que significa que su función no es esencial para la existencia del hongo y se presenta cuando el moho vive en condiciones adversas (sequías, cosecha, quema de campos). Son producto de rutas metabólicas secundarias, es decir, que tienen lugar cuando el hongo no puede obtener energía de manera óptima a través de rutas metabólicas habituales (Whitlow y Hagler, 2004; Butkeraitis *et al.*, 2008; Jouany *et al.*, 2009).

Las micotoxinas pueden sintetizarse en el cultivo del campo, durante la cosecha, durante el procesamiento, el almacenaje o la alimentación. Cuando los animales consumen alimento contaminado con micotoxinas, padecen problemas inmunitarios, reproductivos, oncogénicos, etc. A este desorden se le llama micotoxicosis (Whitlow y Hagler, 2004).

El Deoxinivalenol (DON) es una micotoxina de la familia de los tricotecenos que es de las más comunes en la contaminación del alimento para animales, por lo que es la más estudiada en porcinos. Los cerdos son la especie más sensible al DON, pueden presentar molestias abdominales, diarrea, vómito e incluso shock o muerte. Además, el DON puede inducir la apoptosis y la degradación de la integridad de la barrera intestinal en las células epiteliales, lo que aumenta la susceptibilidad de los animales a la infección por patógenos intestinales como la *Escherichia coli* (ETEC) K88 enterotoxigénica, que comúnmente induce diarrea en los lechones, reduce la tasa de crecimiento y causa mortalidad, lo que produce grandes pérdidas económicas (Pierron *et al.*, 2016 y Li *et al.*, 2019).

La fumonisin B1 (FB<sub>1</sub>) es el diéster del ácido propano-1,2,3-tricarboxílico y el 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidroxihexosano. La función de la amina primaria y las cadenas laterales del ácido tricarbálico parecen ser necesarias para la actividad biológica de FB<sub>1</sub>, ya que la fumonisin N-sustituida y la fumonisin hidrolizada no producen efectos negativos tanto *in vitro* como *in vivo*. FB<sub>1</sub> tiene un grupo amino primario no sustituido en C2 e inhibe de manera competitiva la ceramida sintasa, lo que da como resultado la interrupción de la biosíntesis *de novo* de la ceramida y la alteración del metabolismo de los esfingolípidos. Una

consecuencia inmediata de la inhibición de la ceramida sintasa es la acumulación de los sustratos de la enzima esfinganina (Sa) y, en menor grado, la esfingosina (So) en tejidos, suero y orina. De hecho, el aumento en la relación Sa:So en tejidos y biofluidos se explora como biomarcador de la exposición a la fumonisina en varias especies, aunque estas modificaciones de los perfiles de bases esfingoides son transitorias (Pierron *et al.*, 2016).

El consumo de alimentos contaminados con micotoxinas induce daño a la integridad y permeabilidad intestinal. Se han observado lesiones epiteliales como atrofia multifocal, fusión de vellosidades, necrosis apical de vellosidades, vacuolización de enterocitos y edema de lámina propia en el intestino de cerdos alimentados con una dieta naturalmente contaminada con DON. No se observó efecto en la profundidad de la cripta. Las lesiones yeyunales, incluidas las vellosidades acortadas y unidas, la lisis de enterocitos y el edema, también se observaron en un modelo *ex vivo* (explantes) de tejidos intestinales después de la exposición al DON. La exposición a fumonisinas también induce cambios en la morfología de las vellosidades intestinales, como la reducción de la altura de las vellosidades, la fusión de las vellosidades y la atrofia. Como se describe en las aves de corral, los cambios morfológicos pueden llevar a una disminución de la absorción de nutrientes por los enterocitos, a una reducción de la energía y la absorción de nutrientes y al deterioro del crecimiento (Pierron *et al.*, 2016).

#### Efecto de las micotoxinas en cultivos celulares

Algunas micotoxinas como la Ocratoxina A, la Aflatoxina B1 (AFB<sub>1</sub>) y la Fumonisina B1 (FB<sub>1</sub>) son capaces de producir varios efectos citotóxicos tanto en animales como en humanos. Esto se ha demostrado en células Caco-2 *in vitro*, donde las micotoxinas han causado baja viabilidad, decrecimiento de la resistencia eléctrica transepitelial y reducción de los niveles de expresión de claudinas y ocludinas (Romero *et al.*, 2016).

Tanto el DON como el FB<sub>1</sub> alteran las funciones de la barrera intestinal probados en cultivos celulares de riñón de mono y humanos, así como, en células intestinales de cerdo neonato (IPEC). Varios estudios han investigado el efecto de DON en la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), el cual es un indicador de la integridad de las uniones estrechas celulares, que actúan como una barrera selectiva a nivel intestinal. El DON disminuye la TEER en células epiteliales intestinales de cerdo de manera dependiente del tiempo y la dosis. De manera similar a DON, la FB<sub>1</sub> afectó la integridad de la monocapa de yeyuno (Pierron *et al.*, 2016).

## HIPÓTESIS

La Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) y el Deoxinivalenol (DON) alteran la morfología y el citoesqueleto de enterocitos de embrión pollo en un cultivo celular primario.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de fumonisina (FB<sub>1</sub>) y Deoxinivalenol (DON) a tres diferentes concentraciones en un cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar el efecto de la fumonisina (FB<sub>1</sub>) y el Deoxinivalenol (DON) sobre la morfología celular en un cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo.
- 2.- Evaluar el efecto de la fumonisina (FB<sub>1</sub>) y el Deoxinivalenol (DON) sobre el citoesqueleto (filamentos de actina) en un cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo.

### 1.- Diseño experimental

Se utilizaron embriones de pollo (*Gallus gallus domesticus*) Libres de Patógenos Específicos (SPF) por parte del laboratorio Diagnósticos Clínicos Veterinarios a cargo de la MVZ Rosalia Vigeras Moreno para obtener cultivos primarios de intestino de embrión de pollo.

Una vez alcanzada una confluencia de 80-90% en la placa de cultivo celular primario se realizaron pases celulares para su posterior sembrado en placas de cultivo celular de 24 pozos. Con la confluencia del 100%, los cultivos celulares fueron desafiados con fumonisina B1 (FB1) y deoxinivanelol (DON) a tres diferentes concentraciones (1, 3 y 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y; 0.5, 1 y 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectivamente).

Los tres tratamientos aplicados fueron repetidos tres veces junto con un control para cada concentración (Fig. 1).

En la figura 1 se presentan los tratamientos distribuidos en la placa de cultivo de 24 pozos. Cada número fue asignado a un tratamiento y las letras A, B y C son las repeticiones de cada tratamiento. En la letra D se encuentran los controles de cada tratamiento.

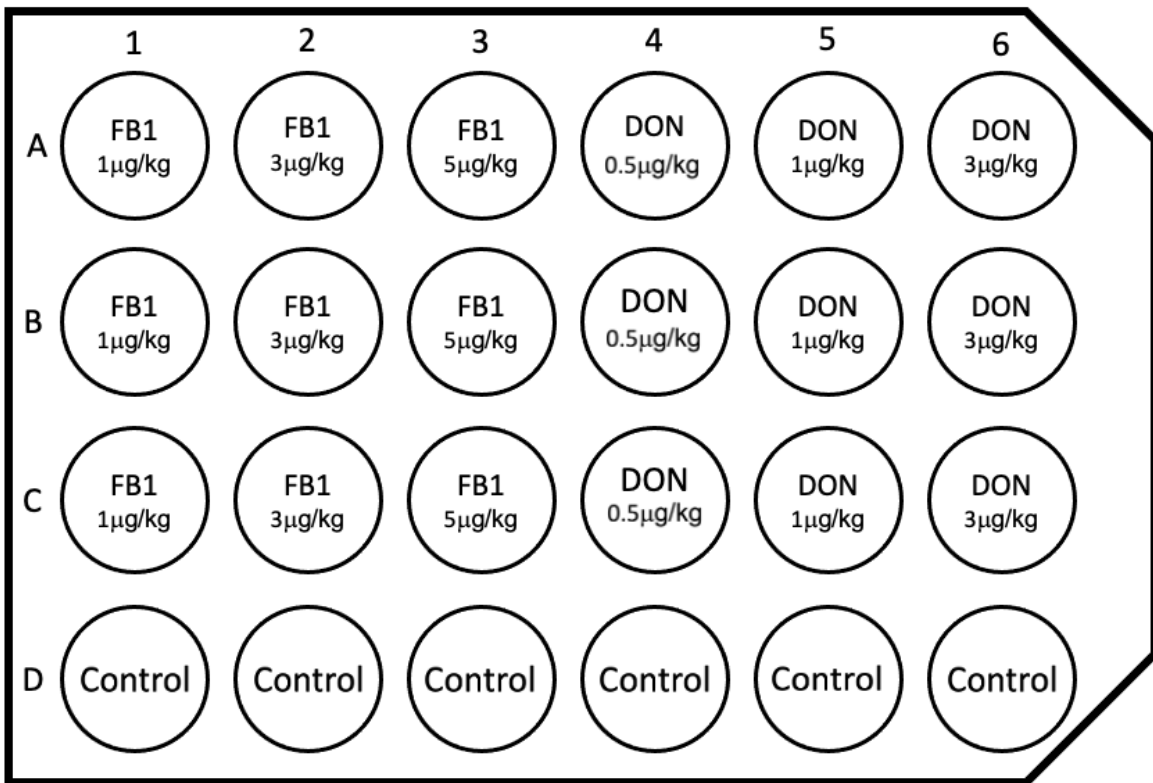


Figura 1. Esquema de los tratamientos aplicados a las células crecidas en placas de cultivo de 24 pozos.

## METODOLOGÍA

El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Campo 4 de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio 14 de “Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis” y Laboratorio 4 de “Morfología Veterinaria y Biología Celular”.

### 1.- Cultivo celular

Se utilizaron embriones de 9-14 días de incubación SPF de pollo (*Gallus gallus domesticus*), donados por el laboratorio Diagnósticos Clínicos Veterinarios a cargo de la MVZ Rosalía Vigeras Moreno, ubicado en la calle de Campesinos 224, Granjas Esmeralda, Iztapalapa, Ciudad de México.

Descripción:

I. Identificación de huevo fertilizado por ovoscopía y desinfección del cascaron con cloruro de benzalconio al 1% (Antibenzil 1:100, Altamirano) al día 11 de incubación (figura 2)

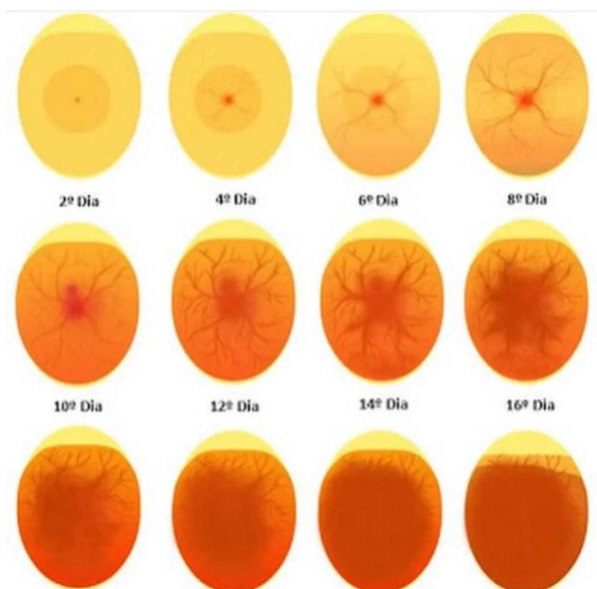


Figura 2. Diagrama de ovoscopía de los huevos.

II. En la campana de flujo laminar (LABCONCO, modelo 3750000), se procedió a romper el cascarón en el extremo romo del huevo y con tijeras se hizo la disección de la membrana testácea interna para exponer al embrión y colocarlo en una caja de Petri con solución salina fosfato amortiguada (PBS) (figura 3, paneles A y B).

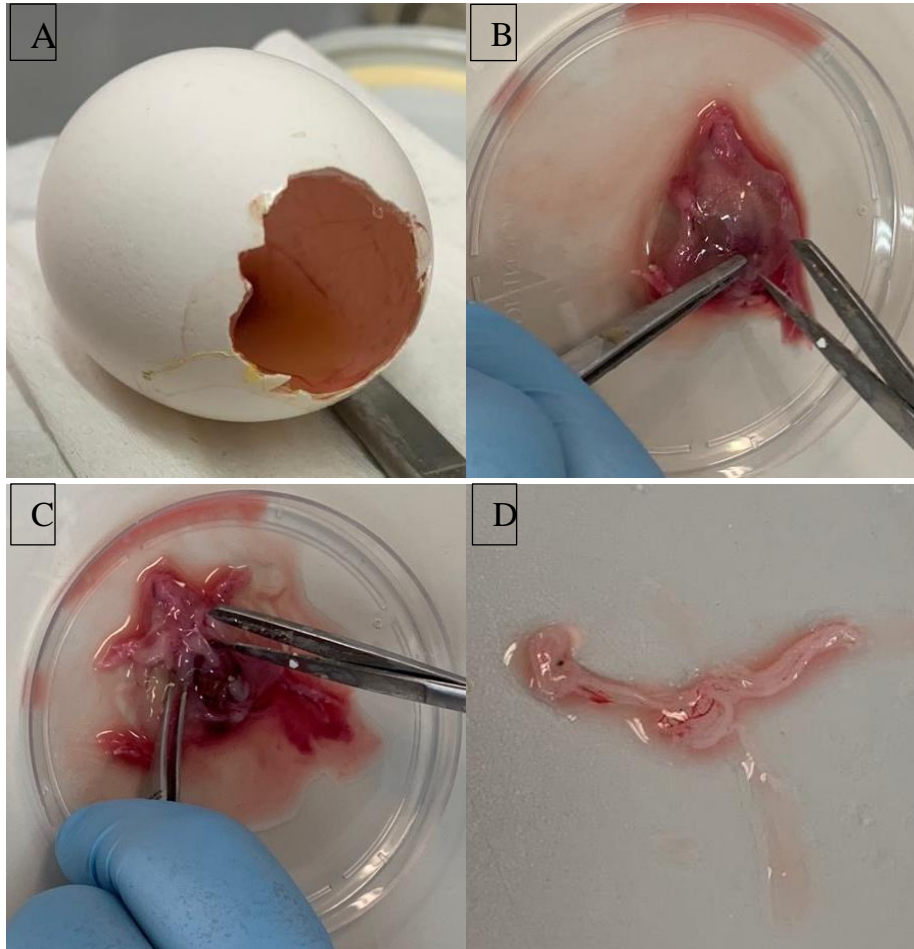


Figura 3. Proceso para la extracción de intestino. **A**, Huevo con membrana testácea íntegra. **B**, Embrión de pollo decapitado. **C**, Apertura de cavidad visceral. **D**, Intestino extraído y sin contaminantes.

III. Se decapitó el embrión y se separó el saco vitelino sin romperlo. A continuación, se cortó la pared abdominal y se ingresó a la cavidad visceral para obtener el intestino. (figura 3, panel C).

IV. Se retiró el tejido conectivo, los eritrocitos u otros tejidos para dejar los intestinos de varios embriones sin contaminantes y se hicieron lavados con PBS hasta tener un sobrenadante transparente (figura 3, panel D).

V. Se realizó la maceración mecánica del tejido intestinal en una caja de Petri con 5ml de PBS. Los intestinos macerados y el sobrenadante se recolectaron en un tubo Falcon de 15ml.



El macerado fue centrifugado a 1500rpm/10min. Posteriormente se eliminó del sobrenadante por decantación y reconstituyó de la pastilla con 9 ml de Medio 199 de la marca Biowest®.

VI. Se realizó la siembra en placa Corning® Costar® de seis pozos de 35mm con 1.5 ml de la solución de la pastilla reconstituida a cada pozo y se observó al microscopio a las 0, 4, 24 y 48 horas para evaluar la fijación de las células en la placa. Realización de pase al alcanzar una confluencia del 80-90%.

VII. El cultivo secundario fue sembrado en placas de 24 pozos con un cubreobjetos en cada pozo y se observa a las 0, 4, 24 y 48 horas. Una vez alcanzada la confluencia del 100% fue posible administrar los tratamientos (figuras 4 y 5).

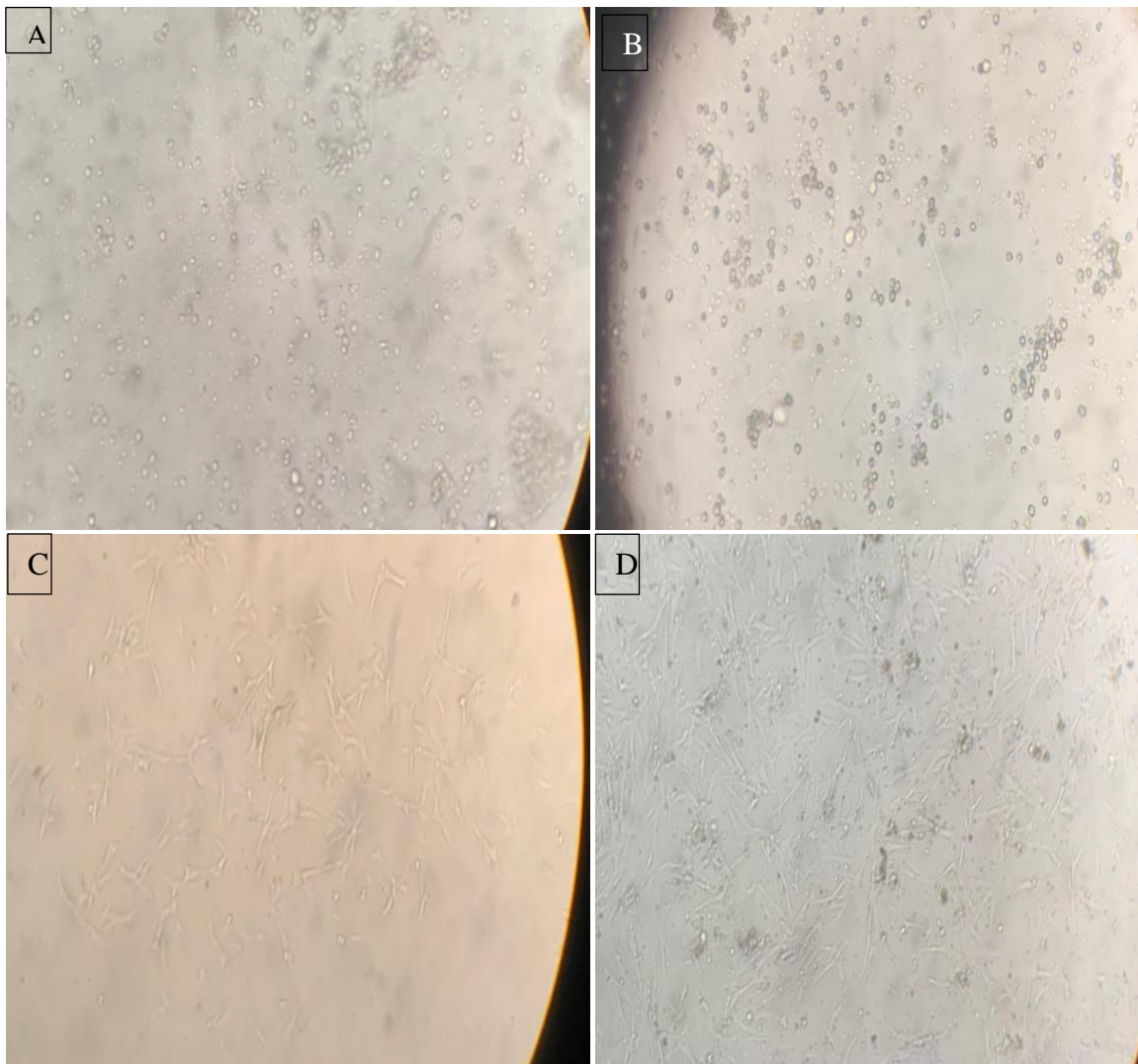


Figura 4. Preparación de cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo en placa de 24 pozos con cubreobjetos. **A**, Cultivo recién sembrado, tiempo cero. **B**, Cultivo a las 4 horas. **C**, Cultivo a las 24 horas. **D**, Cultivo a las 48 horas. 40X Microscopio invertido.





Figura 5. Cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo. Confluencia del 100%. 40X Microscopio invertido.

## 2.- Toxina

La Fumonisina purificada así como el Deoxinivalenol fueron obtenidos de SIGMA-ALDRICH. Se preparó la solución stock de almacenamiento utilizando como diluyente, en el medio de cultivo consistente en medio de cultivo 199 Biowest, BFS (suero fetal bovino) para realizar el ajuste a las concentraciones a utilizar como se indica a continuación:

- 1) Fumonisina B1 (FB1) en polvo F1147, CAS 116355-83-0, PM 721.83, lote 06422Z: 1.4  $\mu$ M, 4.2  $\mu$ M y 6.9  $\mu$ M, lo cual corresponde a 1, 3 y 5 mg/kg.
- 2) Deoxinivalenol (DON) en acetonitrilo CRM46911, CAS 51481-10-8, PM 296.32, lote BCBX5309: 1.7  $\mu$ M, 3.4  $\mu$ M y 10.1  $\mu$ M, lo cual corresponde a 0.5, 1 y 3 mg/kg.

## 3.- Morfología celular y estructura de los filamentos de actina.

### 3.1.- Morfología celular.

Para su evaluación las células fueron tripsinizadas del cultivo primario, posteriormente se sembraron en placas de 24 pocillos (diámetro de 2 cm<sup>2</sup> por pozo) con una concentración de  $3 \times 10^5$  células por pocillo. Posteriormente se incubaron por 48 h para obtener una confluencia del 100%.

A cada pocillo se añadió la FB<sub>1</sub> y el DON en concentraciones de 1.4  $\mu$ M, 4.2  $\mu$ M y 6.9  $\mu$ M de FB<sub>1</sub>, y 1.7  $\mu$ M, 3.4  $\mu$ M y 10.1  $\mu$ M de DON, por triplicado.

El cultivo fue revisado y fotografiado a las 12, 24 y 48h para su evaluación morfológica, con base en lo recomendado por Orsi (2009).

### **3.2.- Estructura de filamentos de actina.**

Para evaluar la estructura celular con respecto a las características de los filamentos de actina, una vez alcanzada una confluencia del 100% en la placa (48h), se realizó una adición de las micotoxinas FB<sub>1</sub> y DON a las concentraciones de 1.4 µM, 4.2 µM y 6.9 µM; y 1.7 µM, 3.4 µM y 10.1 µM respectivamente, con un periodo de contacto de 24 horas. Al grupo control se le administró agua destilada y cada grupo se repitió por triplicado.

Para identificar los filamentos de actina se utilizó la técnica de fluorescencia directa, con faloidina conjugada a rodamina como marcador.

Primero se eliminó el medio de cultivo y las células se fijaron con formalina acuosa al 10% en amortiguador salino de fosfatos (PBS) durante 20 min. Posteriormente las células se permeabilizaron con detergente Tritón X-100 al 0.5% en PBS por 5 min y se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS por 20 min. Se eliminó la BSA, se adicionó la faloidina conjugada con rodamina para marcar los filamentos de actina y se llevó a incubación por 20 min (Jardon *et al.*, 2018).

Después de cada paso, se realizaron 3 lavados con PBS. Finalmente se hizo un lavado con agua desionizada y se realizó el montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos utilizando medio de montaje Ultra Cruz adicionado con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para marcar los núcleos. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, modelo Axioskop40 con epifluorescencia) (Roblero, 2016).

## RESULTADOS

La figura 7 corresponde a células formando una monocapa con una confluencia del 100%. Se presenta sin adición de micotoxinas. El número de células (confluencia de 100%) y su organización (cada célula a lado de otra, de formas alargadas y delgadas) conforman una monocapa con morfología epitelial.

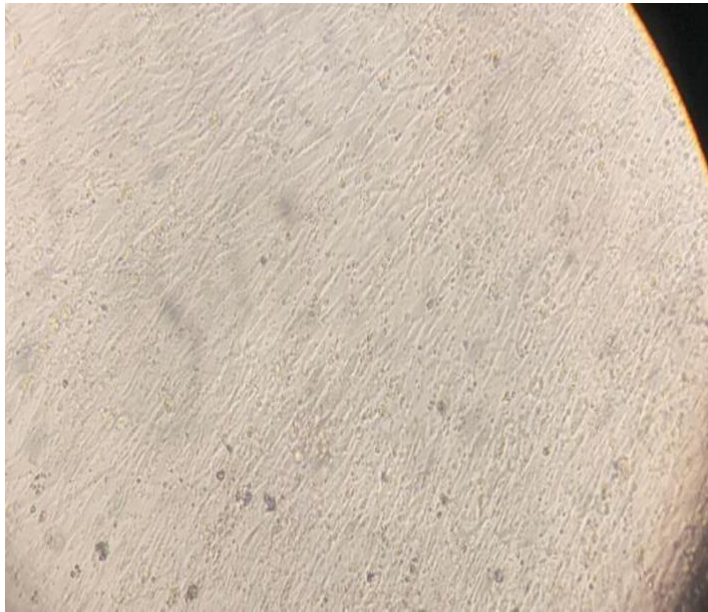


Figura 7. Confluencia del 100% a las 48h (40X)  
Microscopio invertido.

Las células que se observan en la figura 8, A y C, que corresponden a la concentración baja 1.4  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  a las 24h, se observa la muerte de las células, presentándose una confluencia de entre 75 y 90%. En el caso del panel C, adicionalmente, se presenta una acumulación ligera de detritus celulares

Las células que se observan en los paneles B y D, que corresponden a la concentración baja 0.5  $\mu\text{M}$  de DON a las 24h, tienen una forma delgada con ligero acortamiento en comparación con las células del grupo control. La confluencia se aproxima al rango de 70-80%. Hay presencia de detritus celulares en baja cantidad y, en el panel D, se observan células redondas y brillantes que se encuentran suspendidas en el medio de cultivo.

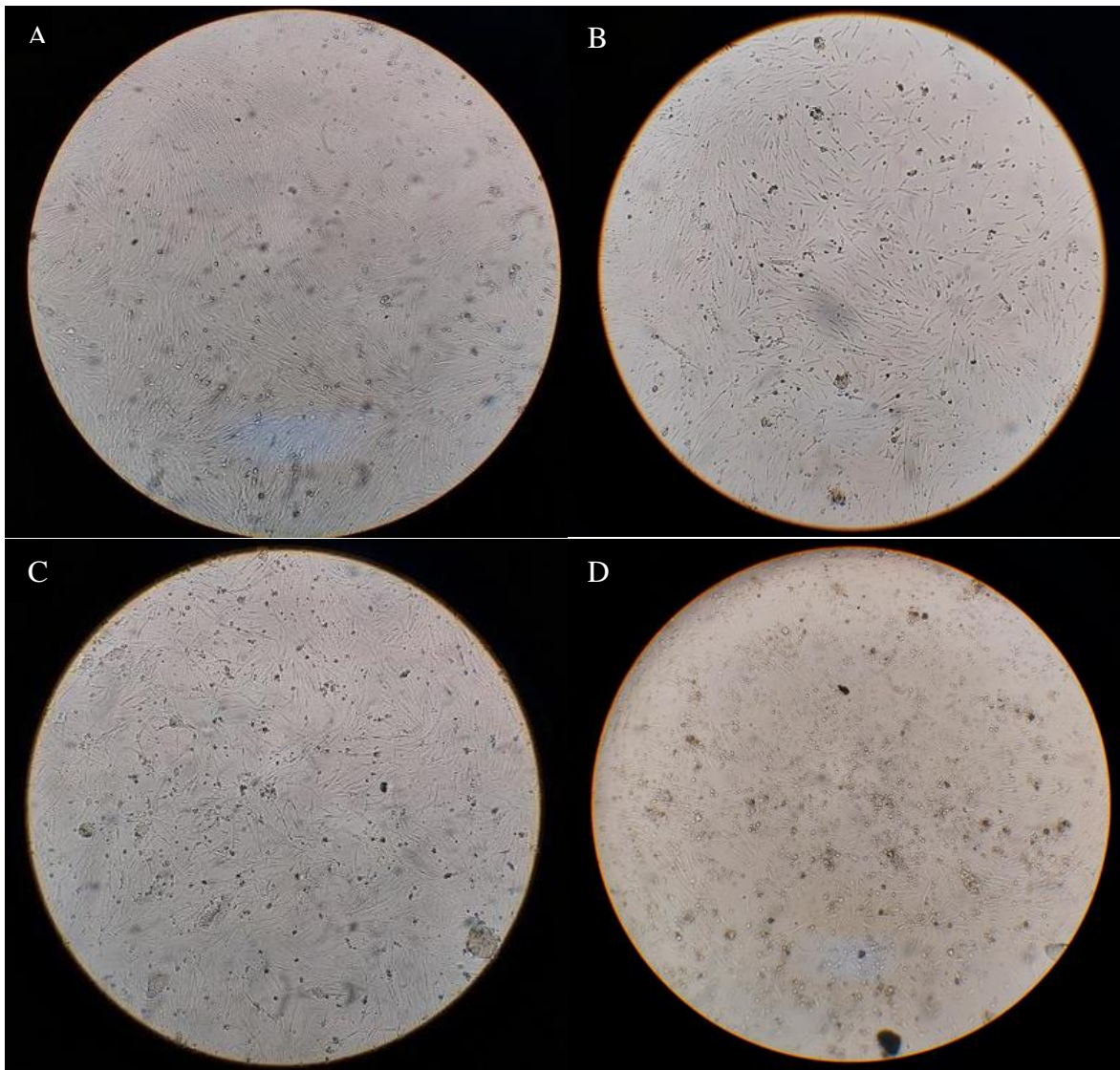


Figura 8. Efecto de las micotoxinas sobre el cultivo primario de enterocitos de pollo a las 24 horas post desafío con Fumonisina B1 ( $\text{FB}_1$ ) a 1.4  $\mu\text{M}$  y Deoxinivalenol (DON) a 0.5  $\mu\text{M}$ . **A**, Concentración baja 1.4  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  a 24h postinoculación **B**, Concentración baja 0.5  $\mu\text{M}$  DON a 24h postinoculación **C**, Concentración baja 1.4  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  a 24h postinoculación **D**, Concentración baja 0.5  $\mu\text{M}$  DON a 24h postinoculación. Microscopio invertido, 40X.



En la figura 9, A y C, que corresponden a la concentración media 3  $\mu\text{M}$  de FB<sub>1</sub> a las 24h, se observan detritus celulares acumulados ligeramente. Las células presentan una confluencia entre 50 y 60%. La forma de aproximadamente la mitad de las células se aprecia adelgazadas en comparación de las células del grupo control. En las paneles B y D, que corresponden a media 1  $\mu\text{M}$  de DON a las 24h, se aprecia una confluencia del 30%. En comparación con el grupo experimental de baja concentración de Deoxinivalenol a las 24 horas (figura 8, paneles B y D), la mayoría de las células se perciben con un mayor adelgazamiento. Hay una ligera acumulación de detritus celulares.

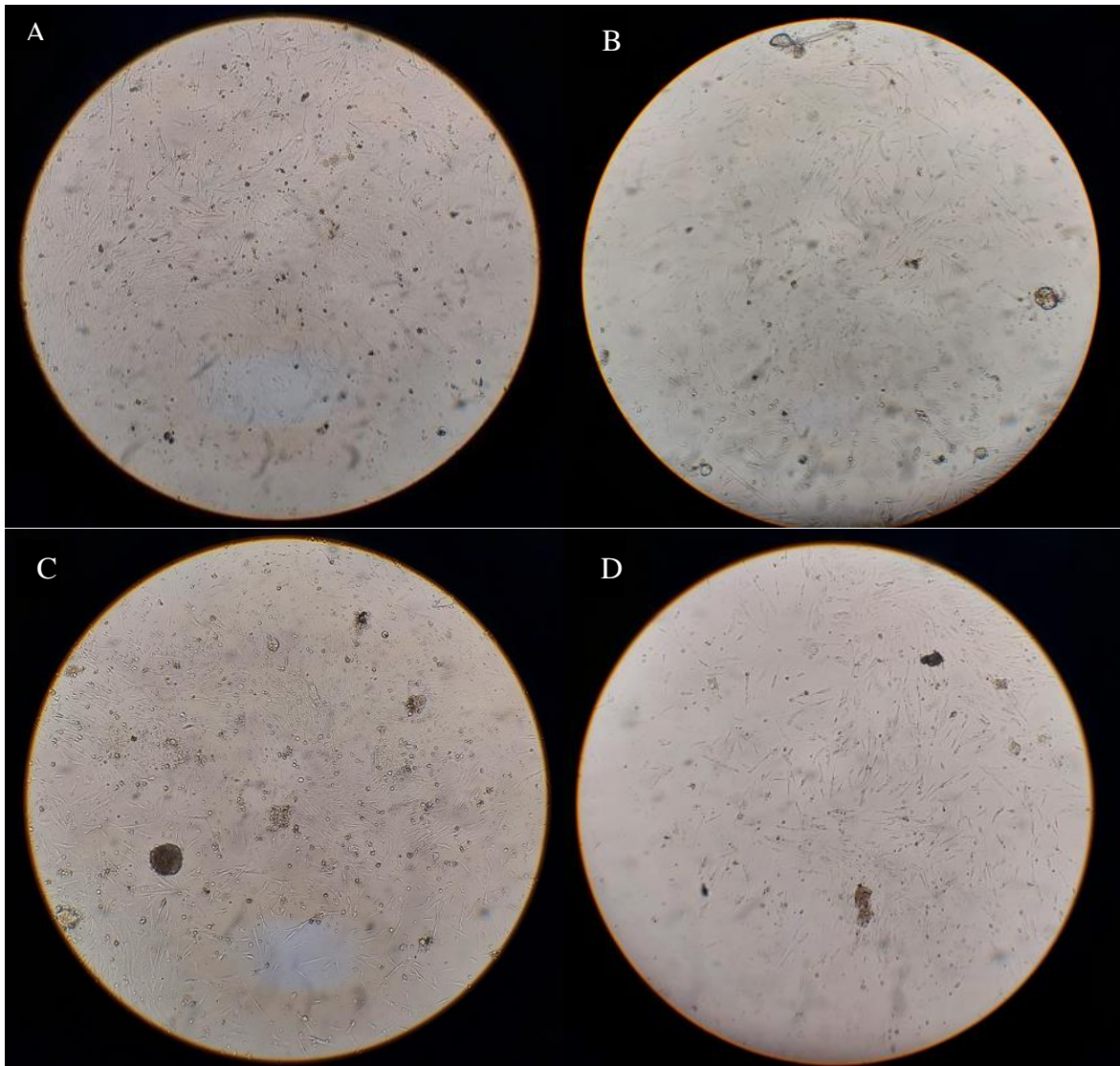


Figura 9. Efecto de las micotoxinas sobre el cultivo primario de enterocitos de pollo a las 24 horas post desafío con Fumonisina B1 (FB<sub>1</sub>) a 4.2  $\mu\text{M}$  y Deoxinivalenol (DON) a 3.4  $\mu\text{M}$ . **A**, Concentración media 3  $\mu\text{M}$  FB<sub>1</sub> a 24h postinoculación. **B**, Concentración media 1  $\mu\text{M}$  DON a 24h postinoculación. **C**, Concentración media 3  $\mu\text{M}$  FB<sub>1</sub> a 24h postinoculación. **D**, Concentración media 1  $\mu\text{M}$  DON a 24h postinoculación. Microscopio invertido, 40X.

La figura 10, A y C, que corresponden a la concentración alta 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  a 24h, muestran una confluencia que va del 10 al 30%, la forma de las células presentes es delgada y alargada. La presencia de detritus celulares es muy evidente en comparación con los grupos experimentales a concentraciones media y baja de Fumonisina a las 24 horas (figuras 8 y 9).

En el panel B, que corresponde a la concentración alta 3  $\mu\text{M}$  DON a 24h, se observa una confluencia de 10%, presencia moderada de detritus celulares y la forma de las células se nota con un adelgazamiento mayor al de los grupos experimentales a concentraciones media y baja de DON a las 24 horas (figuras 8 y 9). El panel D muestra una confluencia de 0% y los detritus celulares son abundantes. No se observan células formando la monocapa.

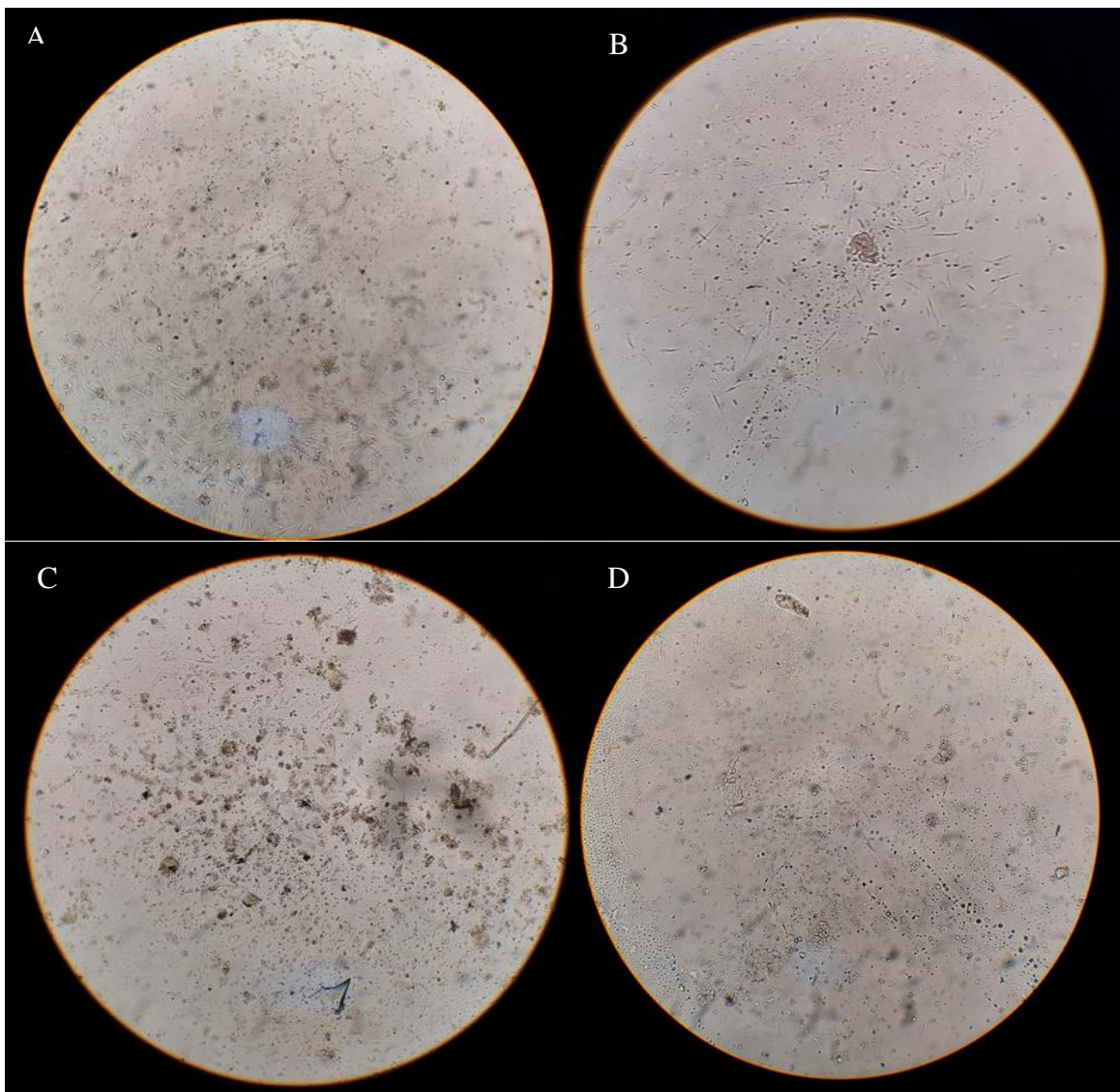


Figura 10. Efecto de las micotoxinas sobre el cultivo primario de enterocitos de pollo a las 24 horas post desafío con Fumonisina B1 ( $\text{FB}_1$ ) a 6.9  $\mu\text{M}$  y Deoxinivalenol (DON) a 10.1  $\mu\text{M}$ . **A**, Concentración alta 5  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  a 24h postinoculación. **B**, Concentración alta 3  $\mu\text{M}$  DON a 24h postinoculación. **C**, Concentración alta 5  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  a 24h postinoculación. **D**, Concentración alta 3  $\mu\text{M}$  DON a 24h postinoculación. Microscopio invertido, 40X.



A las 48 horas (figura 11), las células de los tres grupos experimentales se muestran en su mayoría con una forma adelgazada y alargada, esta característica se aprecia con menor severidad en la concentración baja (panel B) y con mayor severidad en la concentración alta de FB<sub>1</sub> (panel D). Los detritus celulares se presentan en mayor cantidad en el grupo experimental con la concentración más alta de FB<sub>1</sub> (panel D). Los grupos experimentales con concentraciones media y baja presentan una ligera acumulación de detritus celulares. La confluencia en los tres grupos experimentales a las 48 horas se encuentra entre 40 y 50%.

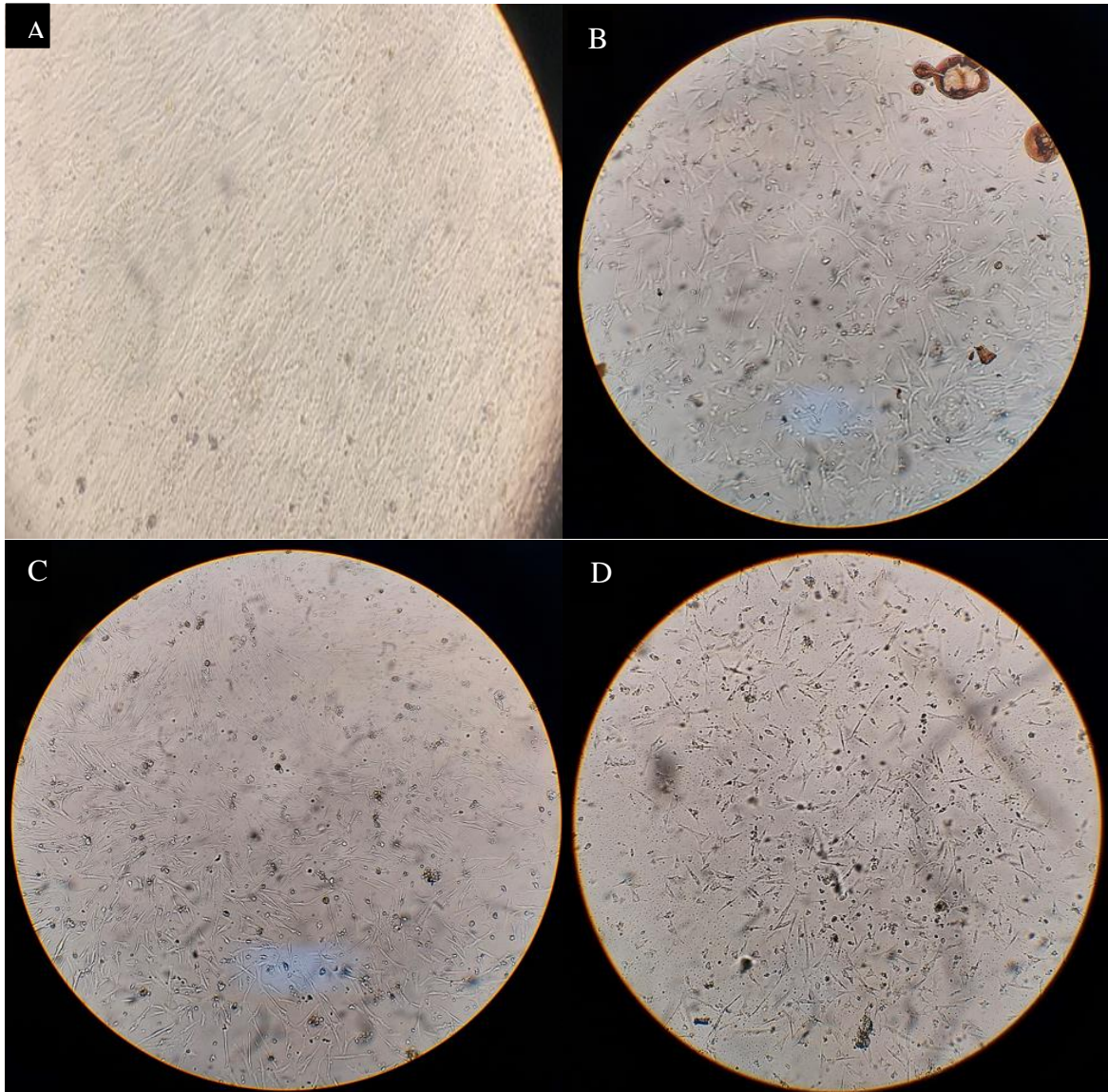


Figura 11. Efecto de las micotoxinas sobre el cultivo primario de enterocitos de pollo a las 48 horas post desafío con Fumonisina B1 (FB1) a 1.4  $\mu$ M, 4.2  $\mu$ M y 6.9  $\mu$ M. **A**, Confluencia del 100% a las 48h sin micotoxina. **B**, Concentración baja 1.4  $\mu$ M FB1 a 48h postinoculación. **C**, Concentración media 4.2  $\mu$ M FB1 a 48h postinoculación. **D**, Concentración alta 6.9  $\mu$ M FB1 a 48h postinoculación. Microscopio invertido, 40X.

En la figura 12, B y C, que corresponden a concentraciones baja 0.5  $\mu\text{M}$  de DON y media 3.4  $\mu\text{M}$  de DON a las 48h, la confluencia se presenta en el rango de 35-45%. La forma de las células es delgada y corta. Los detritus celulares se presentan moderadamente.

En el panel D, correspondiente a la concentración alta 10.1  $\mu\text{M}$  de DON, presenta una confluencia del 20%, una alta cantidad de detritus celulares y las células presentes se muestran con un mayor acortamiento que en las concentraciones baja y media de DON a las 48 horas (paneles B y C), el adelgazamiento de éstas también es evidente. Adicionalmente, los bordes del 50% de las células se perciben irregulares.

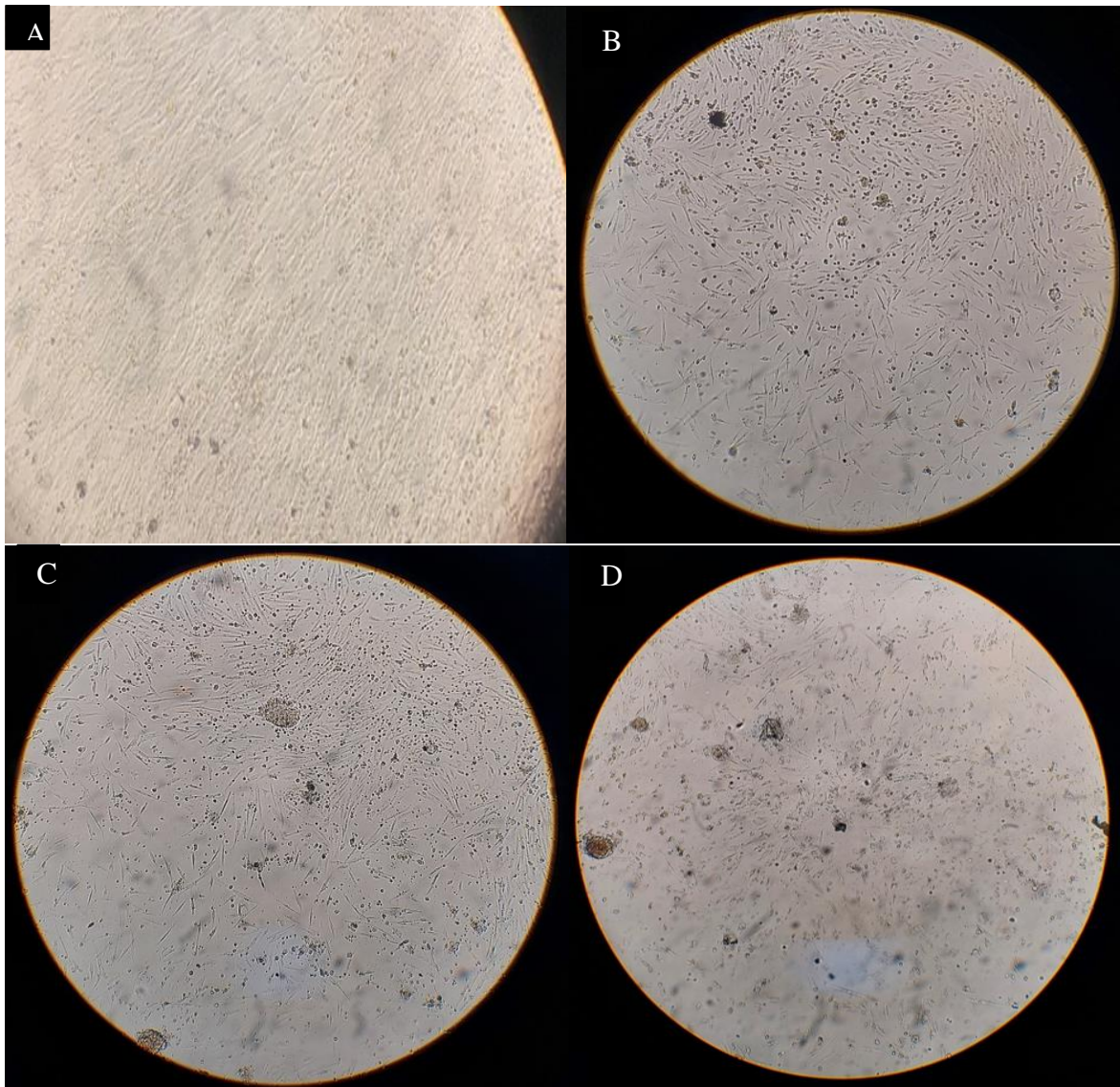


Figura 12. Efecto de las micotoxinas sobre el cultivo primario de enterocitos de pollo a las 48 horas post desafío con deoxinivalenol (DON) a 0.5  $\mu\text{M}$ , 3.4  $\mu\text{M}$  y 10.1  $\mu\text{M}$ . **A**, Confluencia del 100% a las 48h sin micotoxina. **B**, Concentración baja 0.5  $\mu\text{M}$  DON a 48h postinoculación. **C**, Concentración media 3.4  $\mu\text{M}$  DON a 48h postinoculación. **D**, Concentración alta 10.1  $\mu\text{M}$  DON a 48h postinoculación. Microscopio invertido, 40X.



## Citoesqueleto

En la figura 13, se observa una fotografía del cultivo epitelial intestinal de embrión de pollo grupo control, sin adición de micotoxina. Se pueden observar los filamentos de actina marcados en color rojo y en color azul se marcan los núcleos de las células.

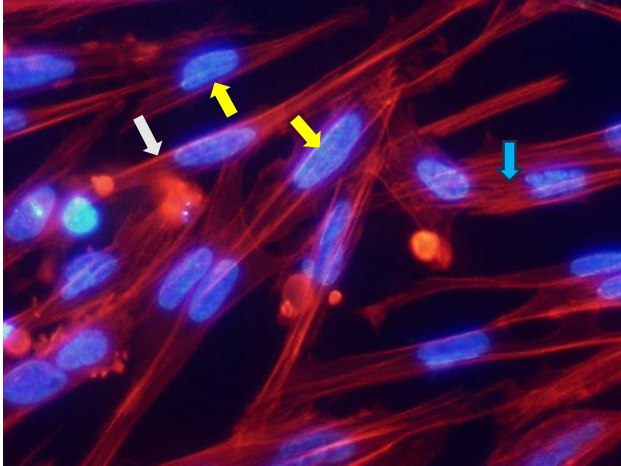


Figura 13. Grupo control. 40X. Microscopio de epifluorescencia

Las flechas amarillas indican los núcleos en color azul con una forma redondeada u ovoide en una posición central con respecto a la célula.

La flecha azul muestra los filamentos de actina en color rojo. Se pueden notar células de morfología alargada a triangular, nótese la forma de las células delimitadas por líneas rojas intensas que corresponden a la corteza celular (flecha blanca), así como líneas rojas tenues dentro del perímetro celular que corresponden a fibras de tensión.

En la figura 14, B, C y D, que corresponden a concentraciones baja 1.4  $\mu\text{M}$ , media 4.2  $\mu\text{M}$  y alta 6.9  $\mu\text{M}$  de  $\text{FB}_1$  a 48h, se observa un menor porcentaje de confluencia de células en función del aumento en la concentración de  $\text{FB}_1$ , presentándose espacios sin células, principalmente en los paneles C y D. Se aprecia la presencia de lamelipodio (panel C). En los paneles B, C y D se observa que la mayoría de las células tienen una forma piramidal.

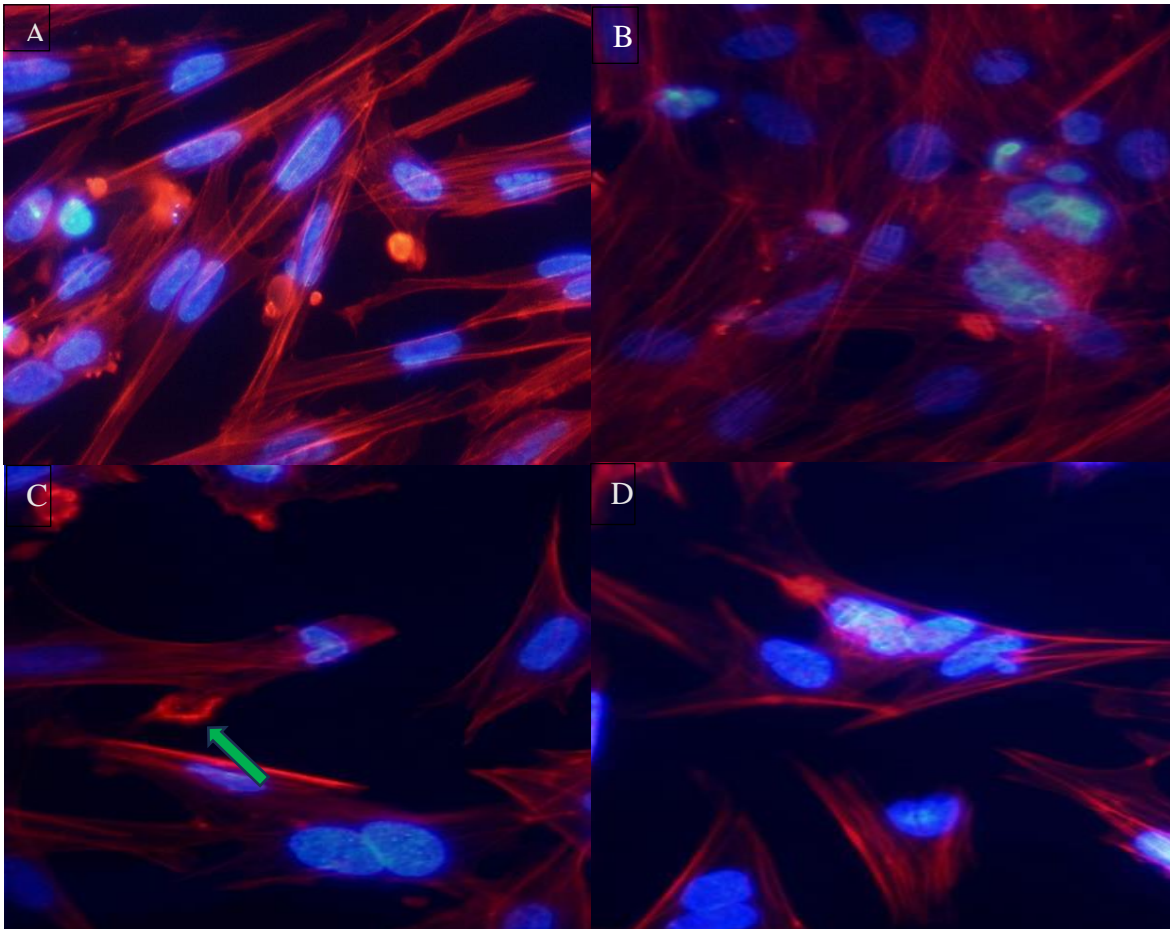


Figura 14. Efecto de las micotoxinas sobre el cultivo primario de enterocitos de pollo a las 48 horas post desafío con Fumonisina B1 ( $\text{FB}_1$ ) a 1.4  $\mu\text{M}$ , 4.2  $\mu\text{M}$  y 6.9  $\mu\text{M}$ . **A**, Confluencia del 100% a las 48h sin adición de micotoxina **B**, Concentración baja 1.4  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  a 48h postinoculación. **C**, Concentración media 4.2  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  a 48h postinoculación. La flecha verde indica la presencia de un lamelipodio. **D**, Concentración alta 6.9  $\mu\text{M}$   $\text{FB}_1$  a 48h postinoculación. Técnica, fluorescencia directa, 40X.

En la figura 15, B, C y D, correspondientes a concentraciones baja 0.5  $\mu\text{M}$ , media 3.4  $\mu\text{M}$  y alta 10.1  $\mu\text{M}$  de DON a 48h, se observa la corteza celular con menor intensidad de color comparado con el grupo control. Tanto los filamentos de actina como los núcleos evidencian una forma alargada de la célula. No hay evidencia de la presencia de filopodios y lamelipodios.

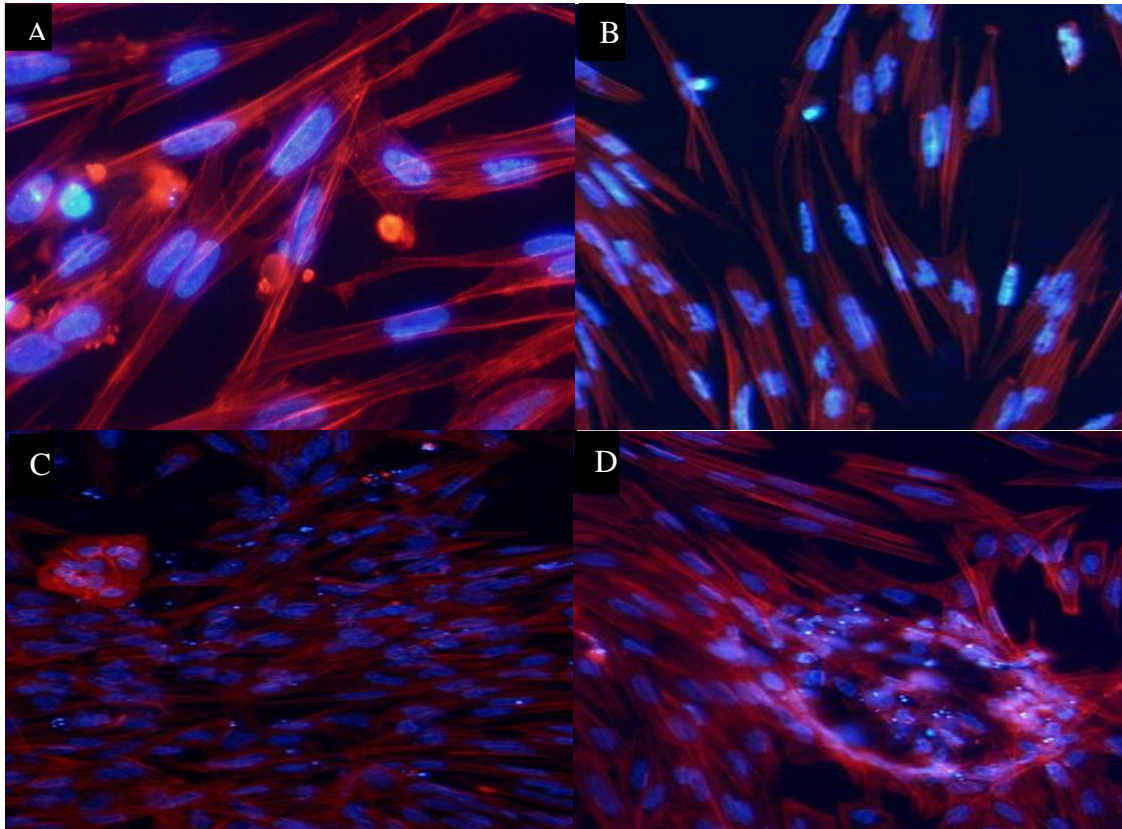


Figura 15. Efecto de las micotoxinas sobre el cultivo primario de enterocitos de pollo a las 48 horas post desafío con Deoxinivalenol (DON) a 0.5  $\mu\text{M}$ , 3.4  $\mu\text{M}$  y 10.1  $\mu\text{M}$ . **A**, Confluencia del 100% a las 48h sin adición de micotoxina, 40X. **B**, Concentración baja 0.5  $\mu\text{M}$  DON a 48h postinoculación, 20X. **C**, Concentración media 3.4  $\mu\text{M}$  DON a 48h postinoculación, 4X. **D**, Concentración alta 10.1  $\mu\text{M}$  DON a 48h postinoculación, 20X. Técnica fluorescencia directa.

## DISCUSIÓN

Este es el primer reporte sobre el efecto de micotoxinas sobre cultivo celular de intestino de embrión de pollo. Estos trabajos tienen la finalidad de observar las alteraciones ocasionadas en un modelo *in vitro* por diversas micotoxinas que afectan la producción animal avícola, así como, comparar los resultados observados en otros cultivos celulares como los enterocitos de cerdo neonato y CACO-2 entre otras. (Salinas, 2020).

De acuerdo a Bohuet y Oswald (2005), las micotoxinas, como ocratoxina A, patulina y deoxinivalenol, son capaces de alterar la función de barrera intestinal, disminuyendo el TEER en líneas celulares de epitelio humano; así como la exposición prolongada de FB<sub>1</sub>, lo que impide el establecimiento de la función de barrera y altera la resistencia de la monocapa ya establecida de la línea celular de epitelio porcino IPEC-1. En este trabajo se observó la pérdida en la conformación de la monocapa en todos los grupos desafiados, lo que podría explicar la alteración en la resistencia transepitelial mencionada por los autores.

Pinton (2009), menciona que DON es capaz causar daño intestinal, tanto *in vivo* como en resultados *in vitro* utilizando una línea celular de epitelio intestinal de porcino (IPEC-1) y la línea celular de adenocarcinoma colorrectal de humanos (CACO-2). Los daños que menciona están relacionados a alteraciones en la expresión de claudinas ocasionando alteración de barrera del epitelio intestinal. En este trabajo se presentaron alteraciones similares, que, aunque no se evaluó la expresión de claudinas, necesarias para mantener las uniones y comunicación entre células, las células de enterocitos de pollo desafiados con FB<sub>1</sub> y DON alteró la confluencia celular, observándose muchos detritus celulares flotando en el medio de cultivo utilizado.

De acuerdo a Romero (2016), algunas micotoxinas, como FB<sub>1</sub>, son capaces de generar citotoxicidad en animales y humanos, causando baja viabilidad en la línea celular CACO-2. La disminución en la confluencia, que se observó en los grupos experimentales sometidos a FB<sub>1</sub> de este estudio, puede ser explicada por los efectos demostrados por Romero (2016) en células CACO-2.

Los cambios en la morfología y la confluencia, junto con la presencia de detritus celulares, sugieren que DON tiene la capacidad dañar a las células epiteliales de embrión de pollo en función de la concentración y el tiempo de exposición. Pierron (2016) destaca que las alteraciones causadas en líneas de células epiteliales de intestino porcino IPEC-J2 y la gravedad dependen del tiempo y la dosis. En este trabajo también se observa daño a las células epiteliales del embrión de pollo conforme se incrementa la concentración y el tiempo de exposición.

En la concentración denominada como alta de Deoxinivalenol (3  $\mu$ M) provocaron muerte celular en un 100%. El mecanismo por el cuál se da la muerte celular lo

describió Pierron (2016), ya que un mecanismo de daño celular es activar los mecanismos de apoptosis.

En la concentración baja de DON (0.5  $\mu\text{M}$ ) se observó el desprendimiento de la monocapa y separación entre las mismas células. Pierron (2016) ha demostrado que existe daño a la integridad de la monocapa en células IPEC-J2, al utilizar concentraciones similares a este estudio. Esta alteración en la morfología celular se debe a que el citoesqueleto se vio afectado al estar presente la micotoxina DON.

Bohuet y Oswald (2005), han mostrado en su laboratorio que  $\text{FB}_1$  altera la proliferación de células indiferenciadas de epitelio intestinal porcino, asociado a un efecto de bloqueo de las células en fase G0/G1 del ciclo celular. Tanto  $\text{FB}_1$  como deoxinivalenol (DON) inhiben la proliferación de células transformadas de epitelio colónico humano. En este estudio se observó un efecto similar al alterar la monocapa están relacionadas con la correcta división de las células, por lo que pudiera existir una correlación entre la baja confluencia de los grupos experimentales observada en este estudio y la capacidad de  $\text{FB}_1$  y DON para inhibir la mitosis celular.

Los resultados obtenidos por Salinas (2020) en cultivo celular RK13 (riñón de conejo), en el daño a citoesqueleto por  $\text{FB}_1$  a concentraciones de 5 y 10 ppm, correspondiendo a 6.92  $\mu\text{M}$  y 13.85  $\mu\text{M}$ , respectivamente, específicamente en los filamentos de actina, fue la disminución en el grosor de la corteza celular y fragmentación de la monocapa. En el presente trabajo también se observó una reducción en el grosor de la corteza celular al teñir los filamentos de actina. Los cambios observados con  $\text{FB}_1$  a 1.4  $\mu\text{M}$ , 4.2  $\mu\text{M}$  y 6.9  $\mu\text{M}$ , que corresponden a 1, 3 y 5 ppm; y DON a 1.7  $\mu\text{M}$ , 3.4  $\mu\text{M}$  y 10.1  $\mu\text{M}$ , que corresponden a 0.5, 1 y 3 ppm en el cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo pueden ser explicados por la toxicidad que presentan particularmente las micotoxinas en células del epitelio intestinal, a diferencia de Salinas (2020) que expresó que AFG2 no genera cambios en las células a ninguna de las concentraciones usadas en su trabajo.

La apoptosis (Pierron, 2016), la baja viabilidad (Romero, 2016) y la inhibición de la mitosis (Bohuet y Oswald 2005), son factores que pueden explicar los resultados obtenidos en este estudio, donde el decrecimiento de la confluencia del cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo fue más evidente con el incremento de la concentración de ambas micotoxinas.



## CONCLUSIONES

1.- Se estandarizó la técnica para un cultivo primario de enterocitos de embriones de pollo (11 días de incubación), realizando modificaciones y ajustando concentraciones de los diferentes medios utilizados, descritos en material y métodos y que permite seguir utilizando el cultivo primario de embrión de pollo como modelo de estudio, dando datos directos a la especie ave y no inferir que alteraciones en otro tipo de células (porcino o humano) son iguales que en pollos.

2.- El citoesqueleto y la morfología del cultivo primario de enterocitos de embrión de pollo se alteró tras agregar fumonisina FB<sub>1</sub> y deoxinivalenol DON, mostrando, el efecto tóxico de ambas micotoxinas en enterocito de pollos. Cabe mencionar que diversos autores descartaron que las FB<sub>1</sub> causara un daño en pollo y que DON tenía poco efecto, a menos que se encontrarán ambas micotoxinas en muy altas concentraciones o bien se tratara de porcinos.

3.- Se demostró el efecto a diferentes concentraciones de cada micotoxina utilizada en este estudio, sobre la morfología celular y sobre el citoesqueleto del cultivo primario de enterocitos de pollo. Correlacionando la dosis con el daño celular, a mayor dosis, mayor daño.

4.- Las concentraciones usadas en este proyecto están correlacionadas con las reportadas en campo. De esta manera podemos inferir que los hallazgos observados *in vitro*, ayudan a poder explicar las alteraciones de los parámetros productivos e incluso inmunitarios observado en las producciones avícolas del país.

5.- La morfología y el citoesqueleto de las células epiteliales de intestino de embrión de pollo desafiadas con las micotoxinas alteró las características histológicas de los filamentos de actina. Por lo que se infiere que se altera la integridad y permeabilidad intestinal.

6.- Deoxinivalenol es la micotoxina que causó mayor alteración morfológica en las células epiteliales en cualquiera de las concentraciones utilizadas. Siendo severo al utilizar 3  $\mu$ M.

7.- Tanto el DON como la FB<sub>1</sub> inhiben la presencia (adelgazamiento) de filopodios y lamelipodios. Estructuras importantes para el movimiento celular, además de, participar en procesos de fagocitosis y pinocitosis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adhikari, M., Negi, B., Kaushik, N., Adhikari, A., Al-Khedhairy, A. A., Kaushik, N. K., & Choi, E. H. (2017). T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. *Oncotarget*, *8*(20). pp. 33933-33952.
2. Arunachalam, C. & Doohan, F. M. 2013. Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals. *Toxicology Letters*, *217*(2). pp. 149–158.
3. Brown, T., & Bailey, A. (2020). Desafíos éticos y metodológicos en la experimentación in vivo. *Journal of Ethics in Science*, *25*(3), 290-305.
4. Bouhet, S., & Oswald, I. P. (2005). The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *108*(1-2). pp. 199–209.
5. Butkeraitis, P., dos Santos, I. & Rodríguez, J. (2008). El efecto de las micotoxinas en rumiantes. *Süd-Chemie de México S.A. de C.V. V. 3*. pp. 1-4.
6. Castaño, M.E. (2008). Cap. 4 Cultivos celulares. En *Principios de virología* (pp. 29-46). Antioquia, Colombia: Fondo editorial Biogénesis.
7. De Castro, C. (2007). Determination of the cytotoxic effects of extracts fractions, or substaces, by means of the MTT test. *Chemistry International. V.29:2*. pp. 21-25.
8. FAO. (2020). Informe anual sobre la industria avícola mundial. \*Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura\*.
9. FAO/OMS. (2018). Evaluación de riesgos de micotoxinas en alimentos de origen animal. \*Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Organización Mundial de la Salud\*.
10. Fernández-Cruz, M., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2020). Estrategias de mitigación de micotoxinas usando cultivos celulares. *Journal of Food Safety*, *40*(2), 123-135.
11. Galarza-Seeber, R., Latorre, J.D., Bielke, L.R., Kuttappan, V.A., Wolfenden, A.D., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Vicente, J.L., Donoghue, A., Cross, D., Hargis, B.M. & Tellez, G. (2016). Leaky gut and Mycotoxins: Aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens. *Front. Vet. Sci.* *3:10*. pp. 1-8.

12. Gimeno, A. & Martins, M. (2011). *Micotoxinas y Micotoxicosis en Animales y Humanos*. Special Nutrients 3<sup>a</sup> ed. pp. 52-53.
13. González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P. & Jaramillo, B.E. (2003). Tight junction protein. *Profress in Biophysics & Molecular Biology* 81. Pp. 1-44.
14. Harris, L. (2019). Fundamentos y técnicas de experimentación. *Journal of Research Methods*, 5(1), 10-25.
15. Heckman, C. A., & Plummer, H. K. (2013). Filopodia as sensors. *Cellular Signalling*, 25(11). pp. 2298–2311.
16. Jardon, S., García, C.G., Quintanar, D., Nieto, J.L., Juárez, M. & Mendoza, S.E. (2018). Effect of two glycyrrhizinic acid nanoparticle carriers on MARC-145 cells actin filaments. *Applied Nanoscience*. 8(5). pp 1111-1121.
17. Johnson, L., & Davis, M. (2019). Nutrición y salud: Un enfoque basado en evidencia. *Nutrition Reviews*, 12(4), 210-222.
18. Jouany, J.P., Yiannikouris, A. & Bertin G. (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Nutritional and foraging ecology of sheep and goats. Zaragoza* 85(12). pp. 205-224.
19. Lee, M., & Kim, J. (2019). Cultivo de epitelio intestinal: Aplicaciones y limitaciones. *Cellular Physiology Journal*, 31(3), 456-468.
20. Li, Y., Wang, J., Li, Y., Wu, H., Zhao, S. & Yu, Q. (2019). Protecting intestinal epithelial cells against deoxynivalenol and *E. coli* damage by recombinant porcine IL-22. *Veterinary Microbiology* 231. pp. 154-159.
21. Li, Y., Wang, Z., Beier, R., Shen, J., De Smet, D., De Saeger, S. & Zhang S. (2011). T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin: review of toxicity, metabolism, and analytical methods. *Agricultural & Food Chemical* 59. pp. 3441–3453.
22. Martínez, A., García, J., & Rodríguez, L. (2018). Uso de modelos biológicos en la investigación. *Journal of Biological Research*, 14(2), 98-107.
23. Moss, R. (2018). Micotoxinas en alimentos: Fuentes, impactos y control. *Food Toxicology Journal*, 10(1), 15-29.
24. OMS. (2020). Inocuidad de los alimentos: Un desafío global. \*Organización Mundial de la Salud\*.



25. Orsi, R.B., Dilkin, P., Xavier, J.G., Aquino, S., Rocha, L.O. & Correa, B. (2009). Acute toxicity of a single gavage dose fumonisin B<sub>1</sub> in rabbits. *Chem-Biol Inter* 179. pp. 351-355.
26. Perusia, O. & Rodríguez, R. (2001). Micotoxicosis. *Rev. Investigacion Veterinaria Perú. Vol 12. Nº 2.* pp. 87-116.
27. Pierron, A., Alassane-Kpembé, I. & Oswald, I.P. (2016). Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. *Porcine Health Management* 2:21.
28. Pinton, P., Nougayrède, J.P., Del Río, J.C., Moreno, C. & Oswald, I.P. (2009). The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 237. pp. 41–48.
29. Roblero, M.L. (2016). *Efecto de la serotonina sobre los filamentos de actina en células RK13*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores UNAM.
30. Rodríguez, P., Fernández, A., & Martínez, M. (2016). Micotoxinas y salud animal: Un enfoque integrado. *Veterinary Sciences Journal*, 20(3), 250-265.
31. Romero, A., Ares, I., Ramos, E., Castellano, V., Martínez, M., Martínez-Larrañaga, María-Rosa., Anadón, A. & Martínez, María- Aránzazu. (2016). Mycotoxins modify the barrier function of Caco-2 cells through differential gene expression of specific claudin isoforms: Protective effect of illite mineral clay. *Toxicology* 353-354. pp. 21-33.
32. SAGARPA. (2021). Informe sobre la producción pecuaria en México. \*Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación\*.
33. Salcedo, R. & Albert, J.S. (2017) El citoesqueleto: un componente fundamental en la arquitectura y en la fisiología celular. *Revista de educación bioquímica*, 35(4), 102-114.
34. Salinas, V. (2020). *Efecto de las fumonisinas y aflatoxinas sobre la viabilidad e integridad celular in vitro*. Tesis de maestría. Facultad de Estudios Superiores UNAM.
35. Sanchís, V., Martí, S. & Ramos, A. J. (2004) Micotoxinas y seguridad alimentaria. *Alimentación, Nutrición y Salud*. 1:17-23.
36. Singh, P., & Gupta, S. (2021). Ventajas y aplicaciones de los cultivos celulares en la investigación biomédica. *Biomed Research Journal*, 32(4), 480-495.

37. Smith, J. (2018). Historia y evolución de la producción avícola. *Poultry Science Journal*, 97(6), 1234-1245.
38. Turner, N., Smith, L., & Jones, D. (2017). Micotoxinas en alimentos: Una revisión. *Journal of Food Contamination*, 24(2), 234-248.
39. Wihlow, L.W. & Hagler, W.M. (2004). Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment. *Proc. Southwest Nutr. Conf.* pp 124-138.
40. Zain, M. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society* 15. pp. 129-144.