



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA
SALUD ANIMAL**

**“EFECTO DE LAS FUMONISINAS Y AFLATOXINAS SOBRE LA
VIABILIDAD E INTEGRIDAD CELULAR *IN VITRO*”**

T E S I S

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

PRESENTA:

V A N E S S A S A L I N A S B I V I A N O

TUTOR PRINCIPAL:

JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DR. RUBEN MERINO GUZMÁN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA UNAM

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

Diciembre 2020



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.

∴ ❁ ∴ ❁ ∴ DEDICATORIAS ∴ ❁ ∴ ❁ ∴

A ti mamá por brindarme tu apoyo incondicional, confianza y seguridad.

A ti papá por enseñarme el valor del trabajo y de la humildad.

A ti hijo, por ser el motor, fortaleza y alegría en mi vida.

A usted Dra. Caro Moreno por su valiosa amistad e impulsarme a crecer.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNAM** por brindarme una vez más la oportunidad de aprender y crecer profesionalmente.

Al **Dr. Juan Carlos del Río García**, mi tutor, quien siempre me mostró su confianza, respeto y apoyo incondicional, gracias Doctor por brindarme las herramientas que hoy enriquecen mi formación profesional, por tener siempre una actitud positiva y alegre en cada una de sus clases, por brindarme la libertad siempre orientada para realizar el proyecto, por escuchar y apoyar mis aportaciones, agradezco las herramientas materiales proporcionadas por usted que permitieron realizar el desarrollo experimental, no tengo palabras para expresar todo mi agradecimiento y admiración hacia usted.

Al **Dr. Carlos Gerardo García Tovar**, parte de mi comité tutorial, de quien me llevo un aprendizaje enorme, no solo en lo académico, sino también en lo personal, y ese aprendizaje sin duda alguna es que el conocimiento se comparte, pues siempre me brindó su ayuda y asesoría para el desarrollo experimental, así como el material necesario para llevar a cabo la experimentación, gracias por la confianza brindada para trabajar en el Laboratorio 4 de “Morfología Veterinaria y Biología Celular”, gracias Doctor por permitirme aprender de usted y su gran equipo de trabajo, fue una experiencia muy grata y enriquecedora para mi formación profesional y personal.

Al **Dr. Rubén Merino Guzmán**, parte de mi comité tutorial, agradezco su dedicación y tiempo para realizar valiosas observaciones que enriquecieron este proyecto, gracias por esa minuciosidad para revisar e impulsarme siempre a mejorar, le agradezco los reactivos brindados para la experimentación, así como su orientación para la redacción de la tesis. El haber trabajado con usted me deja la enseñanza de que siempre se puede ser mejor.

Al **Dr. José Luis Nieto** por enseñarme las bases del cultivo celular, por su orientación y tiempo invertido en mi aprendizaje, agradezco su paciencia y dedicación, gracias por esa actitud de servicio hacia los demás, gracias por enriquecer mi desarrollo profesional.

Agradezco a el **Dr. Ernesto Ávila González**, la **Dra. Gabriela Gómez Verduzco** y al **Dr. Arturo Cortés Cuevas** por aceptar haber sido parte de mi apreciable jurado quienes me apoyaron y brindaron su motivación para culminar esta etapa con satisfacción.

Al **I.B.Q Esteban Fructuoso Alducin** por su tiempo y conocimientos compartidos sobre el manejo de cultivo de embrión de pollo que enriquecieron mi formación profesional en las instalaciones de Sanfer IASA (Investigación Aplicada en Salud Animal).

Gracias **Jacque** y **Saúl**, por su apoyo durante la experimentación, haber trabajado con ustedes fue enriquecedor académica y personalmente. Gracias por acompañarme en esta etapa, por su tiempo y sus palabras de aliento que siempre me brindaron.

A **Jorely Palma Clemente** por su valiosa amistad, en quien encontré no solo una gran compañera sino una amiga. Me quedo con muy bonitos recuerdos de esta etapa amiga, gracias por hacer mi sueño realidad.

A **Antonio Soto Carrillo** por su valioso e incondicional apoyo y tiempo en esta etapa.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**Conacyt**) por su apoyo económico durante el periodo 2018-2020, tiempo de duración del posgrado.

Mis agradecimientos por el apoyo financiero para llevar a cabo el proyecto de investigación al:

- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT). "Efecto de las Micotoxinas sobre las uniones estrechas (Ocludinas y Claudinas) en epitelio intestinal en modelo in vitro e in vivo en pollo de engorda". Clave IN223320

- Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME). " Edublog digital de lesiones morfológicas causadas por Micotoxinas en aves domésticas". Clave PE-213220

- Programa Interno de Apoyo para Proyectos de Investigación (PIAPI). " Efecto de las Micotoxinas y Alimentos Funcionales sobre la Integridad Intestinal, Uniones Estrechas, Inmunidad y Desempeño Productivo en Pollo de Engorda". Clave: PIAPI-1835

RESUMEN

En los últimos años, las fumonisinas y aflatoxinas han demostrado ser las micotoxinas más prevalentes a nivel mundial desde el punto de vista agrícola, contaminando principalmente el maíz y sus derivados. Estudios *in vitro* sobre los efectos de FB1 en diferentes líneas celulares con características epiteliales como Caco-2, IPEC-1 y LLC-PK1, han demostrado la citotoxicidad de esta micotoxina así como su efecto sobre la respuesta inmune y alteración de la barrera de permeabilidad; sin embargo emplean concentraciones superiores ($> 100 \mu\text{M}$ o 72 mg/kg) a las reportadas el campo, además de solo realizar la evaluación del efecto citotóxico o bien del efecto sobre la integridad de barrera, por lo son escasos los estudios que relacionen ambos parámetros para complementar el entendimiento sobre el mecanismo de acción de esta micotoxina. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la FB1 y AFG2 en concentraciones reportadas actualmente en el campo $3\text{-}10 \text{ mg/kg}$ (FB1) y $0.05\text{-}2 \text{ mg/kg}$ (AFG2) sobre los parámetros de morfología, viabilidad, permeabilidad e integridad celular (estructura de citoesqueleto), tras un tiempo de exposición de 48 horas de las micotoxinas sobre la línea RK13 (células epiteliales de riñón de conejo), de la cual existen pocos reportes de su comportamiento frente a micotoxinas. La morfología, viabilidad, permeabilidad y estructura de citoesqueleto presentaron variaciones con respecto a los grupos control. Las aflatoxinas G2 tienen menor efecto que las Fumonisinas B1, pues éstas últimas provocaron alteraciones sobre la estructura del citoesqueleto específicamente sobre los filamentos de actina, lo que resultó en un aumento de la permeabilidad celular que afectó la integridad de la barrera celular y, disminuyó la viabilidad celular.

Palabras clave: *Fumonisina B1, Aflatoxina G2, RK13, viabilidad, citotoxicidad, permeabilidad, integridad, citoesqueleto.*

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Hongos	2
Hongos de campo.....	3
Hongos de almacén.....	3
Hongos de deterioro avanzado	4
Micotoxinas	4
Micotoxicosis.....	6
Aflatoxinas	7
Condiciones de producción	8
Estructura química	8
Propiedades fisicoquímicas.....	9
Mecanismo de acción.....	10
Efectos en diversas especies.	12
Fumonisin s	13
Condiciones de producción	13
Estructura química	14
Propiedades fisicoquímicas.....	14
Mecanismo de acción.....	15
Efectos en diversas especies.	16
Cultivo celular	17
Características: Citoesqueleto.....	18
Filamentos de actina	19
Lamelipodio.....	19
Filopodios	20
Corteza Celular	21
Fluorescencia directa	22
Estudios AF y FB en cultivo celular	23
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
DISEÑO EXPERIMENTAL	28

MATERIALES Y MÉTODOS	29
Cultivo celular.....	29
Micotoxinas	29
Morfología celular	30
Viabilidad celular (MTT)	33
Evaluación del citoesqueleto de actina.....	33
Medición de la Resistencia Transepitelial Eléctrica (TEER).....	35
Análisis estadístico	36
RESULTADOS	37
Morfología.....	37
Viabilidad celular (MTT).....	40
Evaluación del citoesqueleto de actina.....	41
Medición de la Resistencia Transepitelial Eléctrica (TEER).....	43
DISCUSIÓN	46
Morfología	46
Viabilidad	47
Daño a citoesqueleto (filamentos de actina)	49
TEER	50
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
REFERENCIAS	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fase de crecimiento fúngico y síntesis de micotoxinas	5
Figura 2. Estructura química de las principales aflatoxinas.	9
Figura 3. Rutas de biotransformación de la AFB1.	11
Figura 4. Estructura química de las fumonisinas del grupo B	14
Figura 5. Representación de la inhibición de la ceramida sintasa por FB1	16
Figura 6. Filamentos de actina de células RK13 identificados con faloidina rodaminada.	19
Figura 7. Células RK13 en las que se marcaron los filamentos de actina mediante la técnica de fluorescencia directa usando faloidina rodaminada	22
Figura 8 .Micotoxinas Aflatoxina G2 y Fumonisina B1	30
Figura 9. TC20 Automated Cell Counter.....	31
Figura 10. Distribución de microplaca para Aflatoxina G2.....	31
Figura 11. Distribución de microplaca para Fumonisina B1.....	31
Figura 12. Esquema de evaluación morfológica en células RK13	32
Figura 13. Lector de Microplacas BIO-RAD Modelo 550.....	33
Figura 14. Esquema de tinción de filamentos de actina	34
Figura 15. Insertos transwell 0.6 cm ²	35
Figura 16. Esquema de medición de TEER.	36
Figura 17. Cultivo celular Rk13 con diferentes estados de confluencia.....	37
Figura 18 .Efecto de los vehículos sobre el cultivo celular	38
Figura 19. Cultivo control de RK13	38
Figura 20. Efecto en RK13 tras 48 h de exposición a las micotoxinas.....	39
Figura 21. Efecto de FB1 sobre viabilidad de RK13	40
Figura 22. Efecto de AFG2 sobre viabilidad de RK13..	41
Figura 23. Cultivos de RK13 con filamentos de actina marcados con faloidina conjugada a rodamina expuestos 48 horas a FB1.....	42
Figura 24. Cultivos de RK13 con filamentos de actina marcados con faloidina rodaminada expuestos a AFG2 48 h.	43
Figura 25. Comportamiento de cultivo RK13 durante estandarización para medición de resistencia transepitelial.	43

Figura 26. Efecto de FB1 sobre la resistencia transepitelial eléctrica (TEER) en monocapa epitelial de RK13.	44
Figura 27. Líneas de tendencia y ecuaciones que representan el comportamiento de cada una de las concentraciones de FB1 en cultivos RK13.	45
Figura 28. Efecto de AFG2 sobre la resistencia transepitelial eléctrica (TEER) en monocapa epitelial de RK13	46

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.Efectos principales de AFB1 en producción animal	12
Cuadro 2.Resumen de efectos de fumonisina en animales	17

INTRODUCCIÓN

La seguridad o inocuidad de los alimentos es un aspecto prioritario para la industria alimentaria. En el amplio ámbito de las intoxicaciones debidas al consumo de alimentos, el mayor interés se concentra en las levaduras, los mohos, las setas comestibles y las venenosas (Ayala, 2007).

Los hongos son organismos con capacidad de generar un impacto perjudicial o benéfico en la actividad humana debido a su utilización en varios puntos importantes en la historia. Estos organismos son empleados en la elaboración de alimentos o en la producción de antibióticos. Sin embargo, han ocasionado enfermedades en plantas y animales, constituyendo un reto constante en las áreas de investigación, diagnóstico, tratamiento y control (Moreno, 2016).

Los hongos o mohos crecen sobre materiales vegetales produciendo su deterioro. Forman metabolitos secundarios que actúan como antibióticos, favoreciendo la prevalencia del moho frente a otros microorganismos, muchos de los cuales son tóxicos para plantas y/o animales. Estos metabolitos que matan o hacen enfermar a los animales que los consumen se conocen como micotoxinas, y la afección que ocasionan recibe el nombre de micotoxicosis, tienen un efecto perjudicial sobre los consumidores de estos alimentos contaminados. Las micotoxinas pueden definirse como productos naturales producidos por hongos que provocan una respuesta tóxica cuando se introducen a bajas concentraciones en vertebrados superiores y otros animales por una ruta o vía natural (Ayala, 2007).

Las micotoxinas surgen como compuestos de interés toxicológico luego de descubrirse su rol como agentes etiológicos de la “enfermedad X” de los pavos reportada en los años 1960. Esta enfermedad asociada con el consumo de una harina de maní procedente de Brasil causó la muerte de más de 100, 000 pavos en Inglaterra. Con el tiempo se descubrió que ciertas sustancias tóxicas aisladas del alimento causaron dicha enfermedad. Estas sustancias se denominaron “aflatoxinas” ya que el principal hongo productor de estas resultó ser *Aspergillus flavus*. Después de las aflatoxinas se descubrieron otras micotoxinas entre las cuales se incluyen los tricotecenos, la

ocratoxina A, la zearalenona y hacia finales de la década de los noventa un grupo de micotoxinas producidas por hongos del género *Fusarium* a las cuales se les dio el nombre de fumonisinas (Rodríguez, 2010).

Hongos

Los hongos son organismos que tienen un núcleo definido y que poseen características similares a las plantas y los animales. Sin embargo, no están conformados por órganos como hojas, raíces, corazón o pulmones. Sus células son alargadas y al alinearse unas con otras forman filamentos denominados hifas. Estas se entrelazan en una masa similar al algodón llamada micelio. A estos hongos se les denomina filamentosos. No obstante, algunos hongos pueden estar formados por una sola célula; es el caso de las levaduras (Moreno, 2016).

Para su crecimiento, los hongos utilizan una serie de sustancias químicas denominadas metabolitos primarios, como pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos en su mayoría. El uso de estos metabolitos se asocia con la fase de rápido crecimiento (Morales, 2017; Gimeno, 2011 y Soriano, 2007).

Algunos hongos tienen la capacidad genética de producir metabolitos secundarios tóxicos que no son esenciales para el crecimiento, estos se denominan micotoxinas con la consecuente posibilidad de producir micotoxicosis en los animales y humanos que consumen alimento contaminado (Morales, 2017; Gimeno, 2011 y Soriano, 2007).

Para el crecimiento de los hongos de los alimentos y la producción de micotoxinas existen factores que son fundamentales:

Factor Biológico. Sustrato fácilmente utilizable.

Factores Físicos. Actividad de agua (agua libre-humedad). Humedad en los granos (10-18%) y humedad relativa ambiental del 70% o más. Temperatura adecuada la cual varía con el hongo (Ej.: *Aspergillus flavus* puede elaborar toxinas entre 12 y 47°C, y algunos *Fusarium* pueden producirla a temperaturas de congelación).

Además del daño físico del grano que permita el fácil acceso del hongo al interior de éste.

Factores Químicos: pH, composición del sustrato, nutrientes minerales, potencial óxido-reducción, uso de fungicidas. Requerimiento de suficiente O₂ (no indispensable) y CO₂. (Morales, 2017 y Gimeno, 2011).

El tiempo de almacenamiento también es importante ya que a mayor tiempo se tiene mayor posibilidad de condiciones adversas o favorables para el desarrollo, como son puntos calientes en la masa de alimentos producidos por el crecimiento de microorganismos, o bien la alteración de los granos por insectos lo cual abre el camino para el desarrollo fúngico (Perusia, 2001).

Debido a que los hongos son los principales microorganismos presentes en los granos almacenados y constituyen la causa de pérdidas y deterioro durante el almacenamiento, se han dividido en grupos: hongos de campo, hongos de almacén y un tercer grupo denominado hongos de deterioro avanzado.

Hongos de campo.

Los principales hongos de campo encontrados en los granos de los cereales son de los géneros *Cladosporium*, *Helminthosporium*, *Alternaria* y *Fusarium*, los cuales causan la decoloración de los granos y disminuyen el poder germinativo de las semillas. Estos hongos necesitan un alto contenido de humedad y sus esporas pueden sobrevivir por un periodo prolongado de tiempo en granos húmedos; sin embargo, no germinan con humedad relativa menor al 75% (Rodríguez Eloisa, 2009).

Hongos de almacén

Estos hongos se desarrollan después de la cosecha, los que proliferan con mayor frecuencia en los granos almacenados son algunas especies del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, provocan la disminución del poder germinativo, cambios bioquímicos a la pérdida de materia seca en silos y bodegas; estos daños son mayores a los producidos por los hongos de campo (Rodríguez Eloisa, 2009).

Hongos de deterioro avanzado

Dentro de esta clasificación se encuentran *Chaetomium spp*, *Rhizopus spp*, y otros que prefieren la materia orgánica en descomposición (resultante del mal manejo de los granos). Un ejemplo el maíz guardado en mazorcas en el almacén de un campesino, sin ningún cuidado, ahí probablemente se pueda encontrar este tipo de hongos de deterioro avanzado (Rodríguez Eloisa, 2009).

Aspergillus, *Fusarium*, *Claviceps*, *Penicillium* y *Stachybotrys* son mohos contaminantes habituales del ecosistema agropecuario (Serrano-Coll, 2015) con capacidad de infectar cultivos y plantas forrajeras, tanto en el campo como en su almacenamiento, transporte y procesado. Muchos de estos hongos pueden provocar serios problemas en la salud de los animales y su presencia en productos agrícolas supone graves pérdidas económicas (Morales, 2017 y Gimeno 2013).

Micotoxinas

El aseguramiento de la inocuidad de los alimentos se ha constituido en los últimos años en una meta importante de acción internacional y nacional. Resultan preocupantes tanto los peligros microbiológicos como los químicos. Entre los peligros químicos la Organización Mundial de la Salud ha caracterizado recientemente la contaminación de los alimentos y de las raciones con micotoxinas (metabolitos tóxicos de los hongos), de los productos de la pesca con ficotoxinas (toxinas producidas por las algas) y de las especies de plantas comestibles por sus toxinas vegetales como fuentes importantes de las enfermedades transmitidas por los alimentos. De estas tres categorías de toxinas naturales, las micotoxinas son las que más atención han merecido hasta ahora. En varias partes del mundo, las micotoxinas representan un tema de la mayor importancia relacionado con la inocuidad de los alimentos (Van Egmond, 2004).

Los metabolitos primarios son aquellas moléculas sintetizadas durante el crecimiento del hongo, las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos cuando la fase de crecimiento termina o cuando hay deficiencias en nutrientes esenciales. Bajo estas

condiciones los procesos de síntesis se encaminan hacia la producción de pigmentos, antibióticos y micotoxinas, los cuales son excretados de manera abundante durante la fase estacionaria de crecimiento del hongo.

Las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos micotoxigénicos (Figura 1), ya que no son necesarias para el crecimiento de los mismos, pero contribuyen al mantenimiento del organismo en su ambiente natural. Los hongos micotoxigénicos pueden producir uno o más metabolitos secundarios (Morales, 2017; Gimeno, 2011 y Soriano, 2007).

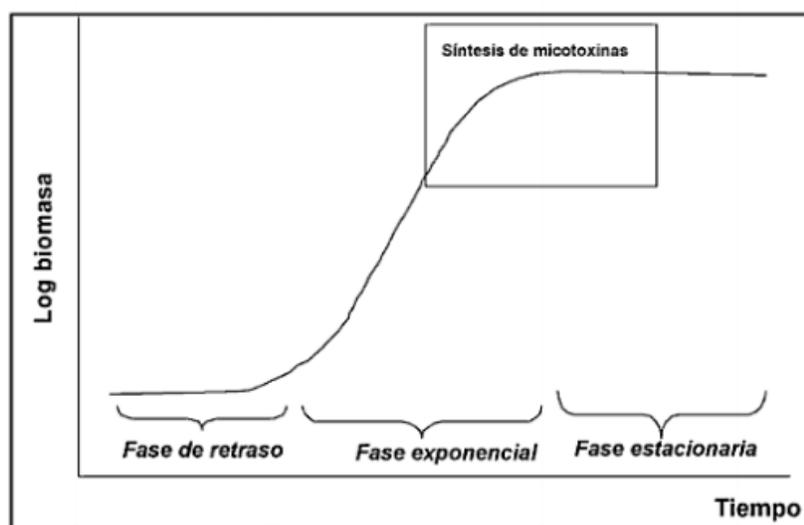


Figura 1. Fase de crecimiento fúngico y síntesis de micotoxinas (Soriano, 2007).

La presencia del hongo toxigénico en un sustrato no implica por necesidad la existencia de micotoxinas. Generalmente solo un pequeño porcentaje de las cepas de hongos posee la capacidad genética de sintetizar micotoxinas y la producción de estos metabolitos ocurre solo bajo estrictas condiciones ambientales que no siempre se cumplen (Rodríguez, 2010).

Las micotoxinas son producidas principalmente por hongos filamentosos bajo unas condiciones óptimas de temperatura que oscilan entre los 20-25 °C, requieren de un pH entre 4 y 8 y una humedad relativa de 80 a 90 %. Por su capacidad toxigénica las micotoxinas más importantes son: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos (deoxinivalenol- toxina T2) y las fumonisinas (Serrano-Coll, 2015).

Las micotoxinas afectan a un amplio rango de productos agrícolas, incluyendo cereales, frutos secos, café, semillas oleaginosas y especias, los cuales son la base de la economía de muchos países en desarrollo. Estos cultivos son susceptibles a la contaminación por hongos y, por tanto, a la producción de micotoxinas. Cuando las micotoxinas son producidas en granos o alimentos destinados a la alimentación de animales o humanos se convierten en un peligro potencial para la salud (Rodríguez, 2010).

Micotoxicosis

El crecimiento de hongos en hospedadores animales produce la colección de enfermedades llamada micosis, mientras que una exposición dietética, respiratoria, dérmica y otras a metabolitos fúngicos tóxicos producen las enfermedades colectivamente llamadas micotoxicosis (Bennett, 2003).

La micotoxicosis es una intoxicación que puede afectar al hombre y los animales y proviene del consumo, inhalación o contacto de alimentos contaminados por micotoxinas que son metabolitos tóxicos producidos principalmente por hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y, en menor grado, *Alternaria* entre otros. Su presencia en granos y alimentos balanceados, tiene un alto impacto en la salud humana-animal y disminuye la calidad y precio de los mismos (Bueno, 2001).

Las micotoxinas poseen la capacidad de producir varios tipos de cáncer en animales domésticos y de experimentación por lo que la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC, 2013) clasificó a las micotoxinas en cuatro grupos de acuerdo con su carcinogenicidad para el hombre:

- Grupo 1. Compuestos carcinógenos para humanos (como la aflatoxina B1).
- Grupo 2. Compuestos posiblemente carcinógenos para humanos (aflatoxina M1, ocratoxina, fumonisina B1).
- Grupo 3. Compuestos no carcinógenos para humanos (como zearalenona y tricotecenos)

- Grupo 4. Agente probablemente no carcinogénico en humanos (Uribe, 2015 y Rodríguez, 2010).

En la actualidad se han identificado más de 200 micotoxinas; sin embargo, las que se pueden encontrar de forma frecuente como contaminantes de alimentos son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, fumonisinas, tricotecenos, citrina y patulina (Morales, 2017 y Gimeno, 2011).

Aflatoxinas

La palabra “aflatoxina” viene de a= *Aspergillus*, fla= *flavus* y toxina= veneno. Las aflatoxinas (AF) son metabolitos secundarios que corresponden químicamente a bis-dihidro-furano-cumarinas. Las AF se descubrieron en Gran Bretaña en 1960, después de la muerte de 100 000 pavos alimentados con cacahuete contaminado con el moho *Aspergillus flavus* y AF provenientes de Brasil (Carvajal, 2013).

Los 3 principales hongos que producen a las AF son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius* (Carvajal, 2013).

Las AF son toxinas de alimentos y la exposición del hombre a ellas es continuo, se encuentran presentes en cereales (maíz, arroz, trigo, sorgo, cebada, avena, milo, centeno y sus productos derivados (tortillas, cereales para el desayuno, harinas, pastas, etc.), en semillas oleaginosas (cacahuete, nueces, avellanas, pistaches, piñones, semillas de girasol, de algodón, ajonjolí y almendras), en especias (chiles, condimentos, paprika, comino, mostaza, etc.), higos y frutas secas. Las AF son las micotoxinas más tóxicas y dañan a todos los animales como el ganado bovino, aviar, equino, porcino, peces, ratas y mascotas como perros y gatos, etc. Contaminan los productos derivados como huevos, lácteos (leche, yogurt, quesos y crema), cárnicos como salami, jamón, pechugas de pollo, patés, embutidos y cervezas, en alimentos balanceados para animales y humanos y sólo hay trazas en vinos. La contaminación por AF en alimentos se produce en almacenes, especialmente si la cosecha está húmeda o en las camas de las aves (Carvajal, 2013).

Condiciones de producción

Los mohos aflatoxigénicos crecen de 8-55°C con temperaturas óptimas de 36-38°C, la producción de AF se inicia a 11-14°C, cesa a menos de 10°C o más de 45°C, la producción óptima de AF va de 25-35°C. La producción de AF se favorece, según el sustrato, por factores bioquímicos, biológicos y ambientales, a una humedad de 10-20% y a una humedad relativa de 70-90%, equivalente a un contenido de humedad del grano del 16.5 a 18%. Las AF se pueden producir en condiciones de campo o almacén al quinto día y disminuyen al octavo. La presencia de hongos aflatoxicógenos no significa la existencia de AF. Las especies productoras de AF de *Aspergillus* requieren estar en cultivos puros, pues *A. chevalieri*, *A. candidus* y *A. niger*, compiten e interfieren con ellos, y se han usado como control biológico (Carvajal, 2013).

Estructura química

La estructura básica de las AF es un anillo dihidrofurano o tetrahydrofurano unido a una cumarina con un anillo de cinco o seis átomos de carbono (figura 2). Las AF se clasifican con base en su fluorescencia bajo la luz UV y su movilidad relativa en cromatografía en capa fina, donde las letras se refieren al color de fluorescencia (*blue* y *green*), mientras que los subíndices 1 y 2 indican componente mayor y menor. Hay alrededor de 20 tipos de AF, las más importantes por su alto potencial cancerígeno, mutágeno y teratógeno son: B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂). Otro metabolito muy tóxico de la AFB₁ es el aflatoxicol (AFL). Sólo AFB₁, AFG₁, y AFG₂ se sintetizan naturalmente de la AFB₁; las otras AF (M₁, M₂, P₁, Q₁, G₂, B₂, y AFL) son productos hidroxilados del metabolismo animal o microbiano de las AFB₁ y AFB₂. La AFB₁ es la más peligrosa y tóxica de todas (Morales, 2017; Gimeno, 2013; Carvajal, 2013 y Gimeno, 2011).

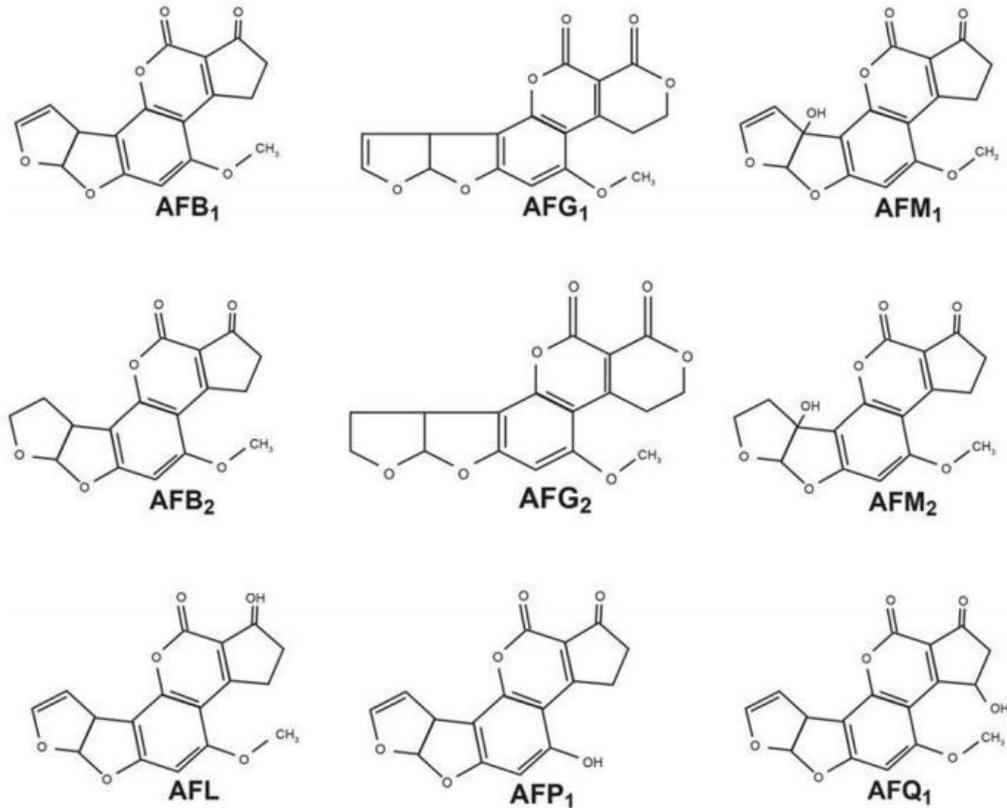


Figura 2. Estructura química de las principales aflatoxinas (Carvajal, 2013).

Propiedades fisicoquímicas

Las AF son cristales sólidos de color que va de blanco al amarillo, sin olor ni sabor, son insolubles en agua y solubles en solventes orgánicos (metanol, cloroformo, acetona, acetonitrilo y dimetilsulfóxido), cuando las AF están en cloroformo o benceno son estables por años en refrigeración y oscuridad. La AF en solución son sensibles a la luz, se descomponen en el aire, oxígeno, soluciones alcalinas o de ácidos suaves y se nombran según el color de la fluorescencia que emana con luz UV de onda larga, en color azul b (*blue*) con anillo de ciclopentano o verde (*green*) con anillo de lactona, lo que permite detectarlas en trazas de 0.5 ng o menos, en cromatografía de capa fina. Las AFB₂ y AFG₂ tienen difuranos saturados. Los subíndices 1 o 2 de las AF tipo B, G, M o P indican la movilidad que tienen en la cromatografía de capa fina según su peso molecular, de 298 (AFP₁) a 33° (AFG₂ Y AFM₂), que da diferentes coeficientes de

retención (RF) que las identifican. Los máximos picos de absorbancia de luz UV son de 265 nm a 362 nm, con una emisión de 425 nm (Carvajal, 2013).

Durante la nixtamalización (pH de 8 a 12), el anillo de lactona de la AF se abre y pierde su fluorescencia y se puede pensar que están ausentes, pero en contacto con soluciones ácidas (pH de 1-3) del jugo gástrico, y regresando a un pH neutro, las AF se reactivan y fluorescen otra vez (Carvajal, 2013).

Las AF entran al organismo con los alimentos, a través de la piel, o bien pueden ser inhaladas, resisten altas temperaturas de 237°C (AFG₂) a 320°C (AFP₁), se descomponen de 237°C a 306°C, según el tiempo de calentamiento, la humedad del alimento y el pH. Así, las AF no se rompen con la ultrapasteurización, cocción, freído o hervido, fermentación, ni nixtamalización, pero se pueden destruir si se calientan en autoclave con amonio o hipoclorito de sodio. Actúan en trazas de millonésimas de gramo (microgramos por gramo =µg /g) o menos (Carvajal, 2013).

Mecanismo de acción

Las AF se ligan o adhieren a ácidos nucleicos de ADN o ARN, y a proteínas, y afectan a todos los seres vivos con ácidos nucleicos, desde virus a vegetales y al humano. El ADN afectado puede almacenar las moléculas de AFB₁ por años, y al tratar de regenerarse corta la porción de nucleótidos donde se pegó la AFB₁ y la elimina por orina, leche o heces.

La AFB₁ se bioactiva a través de los citocromos P450 a un metabolito electrofílico altamente reactivo e inestable que una vez formado reacciona con macromoléculas, especialmente con el ADN (produce alquilación del ADN). Este metabolito, conocido como aflatoxina-8,9-epóxido (AFBO) es capaz de unirse a los residuos de guanina de los ácidos nucleicos y causa alteraciones irreversibles que pueden llevar a carcinogenicidad, mutagenicidad y teratogenicidad. La biotransformación de la AFB₁ se inicia en las enzimas citocromo P450 (CYP450) donde sufre oxidación a AFBO. La forma epóxido puede conjugarse con glutatión para continuar con la vía de detoxificación o ser hidrolizada por una epóxido hidrolasa para generar un hidrodiool (AFB₁-8,9-dihidrodiool o dhd-AFB₁), el cual puede reaccionar fuertemente con proteínas

y tener efectos citotóxicos. En los casos en que el epóxido llega a conjugarse con glutatión, o la AFB₁ no sufre epoxidación sino adición grupos OH- y posterior conjugación con ácido glucurónico o sulfato, los efectos tóxicos de la molécula se ven neutralizados (Figura 3) (Rodríguez, 2010).

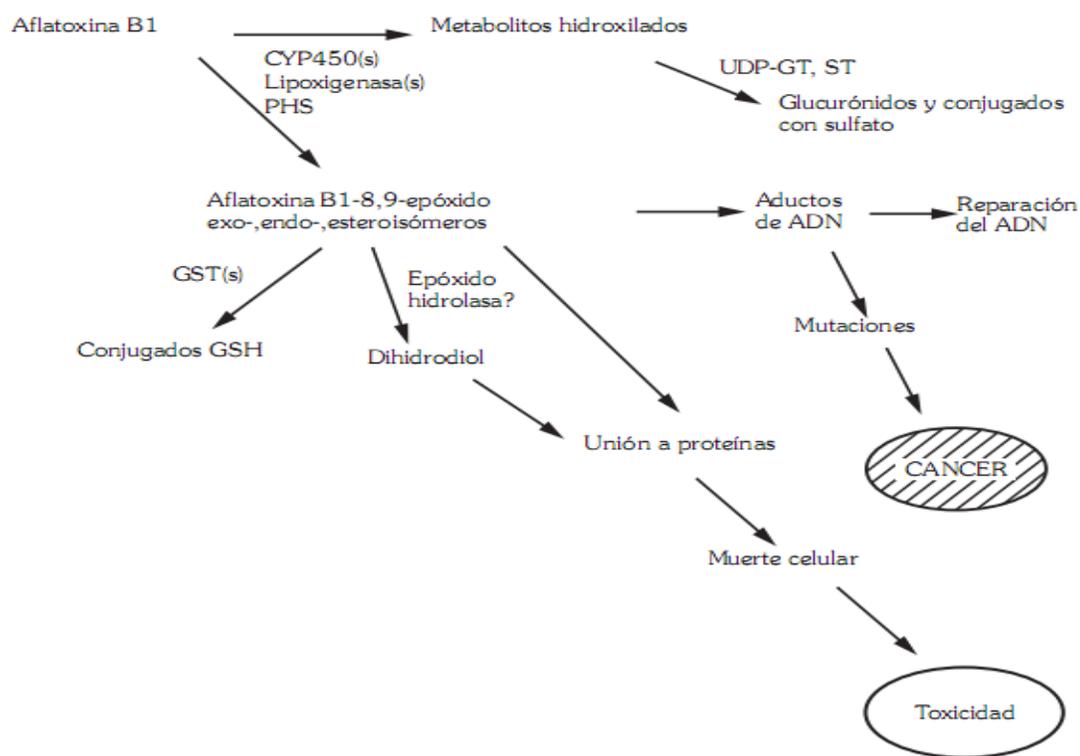


Figura 3. Rutas de biotransformación de la AFB₁, CYP450(s): citocromo P450(s); PHS: prostaglandina H-sintasa; GST(s): glutatión transferasa S-transferasa(s); UDP-GT(s): UDP-glucuronosiltransferasa(s); ST:sulfotransferasas. (Rodríguez, 2010).

Por lo tanto, las AF afectan la absorción y el metabolismo de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales, y su toxicidad afecta el transporte electrónico de la cadena respiratoria y membranas celulares y subcelulares. Las AF ingeridas con los alimentos se absorben por la mucosa intestinal, pasan de la sangre al hígado, riñón, conductos biliares y sistema nervioso. Los cambios citológicos causados por AF en las células vegetales o animales son similares: nucléolos en forma de anillo con capas diferenciadas, numerosos cuerpos lipídicos, mitocondrias con cisternas alargadas, retículo endoplásmico desgranulado, núcleos alargados e irregulares y cromatina con muchos gránulos. La AFB₁ actúa como un antimetabolito que se liga al ADN e interfiere con el ARN y la síntesis de proteínas (Carvajal, 2013).

Efectos en diversas especies.

La AFB₁ se encuentra como un compuesto altamente tóxico para la mayoría de las especies y en especial aquellas muy susceptibles como la trucha arco iris, los gatos o los patos. La toxicidad de las aflatoxinas G1, B2 y G2 en ensayos *in vitro* es aproximadamente 50, 20 y 10% de la que presenta la AFB₁, respectivamente. Existen diferencias de susceptibilidad entre animales de diferentes especies frente a la AFB₁. Los animales más susceptibles son el pato, el conejo y el gato, mientras que los más resistentes son el pollo, ratón, hámster y rata. Las aves más susceptibles son los patos, seguidos de los pavos, gansos, faisanes y los pollos como la especie aviar menos afectada. A su vez, los animales jóvenes son más susceptibles que los adultos y las hembras más resistentes que los machos (Rodríguez, 2010).

Aflatoxina B1	Especies	Efectos
Aflatoxina B1	Aves	Descenso en el crecimiento y en la producción, peso y calidad de los huevos. Presencia de residuos de aflatoxina B1 y M1 en huevos y carne. Reducción de la función inmune e incremento en la mortalidad
	Cerdos	Descenso en el crecimiento, consumo y eficiencia de utilización del alimento. Inmunosupresión, incremento en la incidencia de otras enfermedades, diarrea.
	Bovinos, ovinos y caprinos lecheros	Reducción en la producción de leche y crecimiento. Presencia de residuos de aflatoxina M1 en leche
	Otros rumiantes	Reducción en el consumo, crecimiento y respuesta inmune.

Cuadro 1. Principales efectos de AFB1 sobre la producción animal (Uribe, 2015)

Los caracteres patológicos generales son hepatotoxicidad, carcinogénesis, teratogénesis, mutagénesis e inmunosupresión. En los casos agudos se presenta muerte súbita por fallo hepático y en los crónicos es donde se observan la mayor parte de los síntomas generales descritos y, además, malformaciones fetales, aborto y cáncer de hígado. En animales de granja, las aflatoxinas producen descenso en la productividad por disminución del crecimiento, de la eficiencia alimentaria, y de la respuesta inmunológica, que eventualmente pueden llegar a causar la muerte.

Fumonisin

Fusarium verticillioides es el principal hongo patógeno que afecta la productividad del maíz en el mundo. Este hongo penetra a la planta por distintas rutas e infecta raíces, tallo y mazorca. El patógeno produce varias toxinas en el tejido y en los granos del maíz, lo que disminuye su calidad. Las fumonisin son las toxinas mayoritarias excretadas por el hongo. Sin embargo, la cantidad de fumonisin producida es altamente variable entre cepas del hongo (De la Torre Hernández, 2014).

Las fumonisin son producidas principalmente por *Fusarium verticillioides* (*moniliforme*) y *F. proliferatum*. Estos hongos son contaminantes comunes de sustratos como maíz, arroz, sorgo, cebada, cacahuate y algodón. (Morales, 2017; Brugère-Picoux, 2015; Gimeno, 2013 y Gimeno, 2011).

Existen 6 tipos de fumonisin: B1, B2, B3, B4, A1 y A2; se encuentran con frecuencia como contaminantes la B1, B2 y B3; la fumonisin B1 (FB1) es la más tóxica, y se encuentra como contaminante de los cereales, sobre todo del maíz (Morales, 2017; Brugère-Picoux, 2015; Uribe, 2015; Gimeno, 2013 y Gimeno, 2011).

Condiciones de producción

Las condiciones de temperatura y humedad son factores cruciales que desencadenan la infección por hongos y la producción de micotoxinas en los granos de cereales infectados por *Fusarium verticillioides* (Uribe, 2015).

El pH ácido (4.5), actividad de agua moderada, nitrógeno limitado, alto oxígeno y nutrientes también regulan la síntesis de fumonisin. Las condiciones óptimas para la producción de la toxina son temperaturas entre 22.2 a 27.5° C y AW de 0.87 (Uribe, 2015 y De la Torre Hernández, 2014).

Se ha observado que temperaturas cálidas y secas resultan en una mayor concentración de fumonisin en las cosechas que en condiciones climáticas frías; además existe una relación entre el daño al maíz ocasionado por insectos y las concentraciones de fumonisin (Uribe, 2015).

Estructura química

Las fumonisinas B contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácido tricarboxílico esterificados en C-14 y C-15 (Figura 4) (De la Torre-Hernández, 2014).

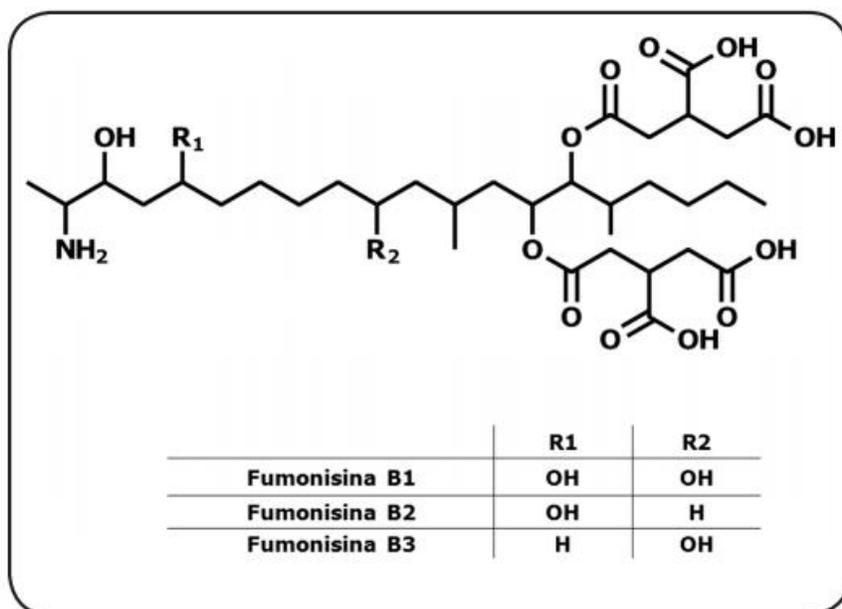


Figura 4. Estructura química de las fumonisinas del grupo B (De la Torre-Hernández, 2014).

Estos compuestos difieren por la presencia o la ausencia de un grupo hidroxilo en los C-5 y C-10. Dentro de esta familia predominan las fumonisinas B1, B2 y B3, pero la B1 (FB1) conforma más del 75% del total de ellas y es la más estudiada. Los niveles de producción de la toxina FB1 son muy variables entre las cepas de *F. verticillioides*, ya que algunas de ellas no la sintetizan o lo hacen a niveles muy bajos; en cambio, otras generan grandes cantidades (De la Torre-Hernández, 2014).

Propiedades fisicoquímicas

Las fumonisinas son compuestos de color blanco, su fórmula molecular es $C_{34}H_{59}NO_{15}$ con un peso molecular de 721g/mol y con poder higroscópico soluble en agua y metanol. Debido a sus 4 grupos carboxilo, derivados del ácido glutámico, grupos hidroxilo y grupos amino derivado de serina y grupos metilo derivados de metionina,

las fumonisinas son solubles en solventes polares e insolubles en solventes orgánicos como el cloroformo y el hexano. Las FB1 y FB2 permanecen estables en metanol a -18°C y en acetonitrilo-agua (1:1) a 25°C por un periodo de 6 meses. La temperatura mayor a 25° degrada la toxina (Uribe, 2015).

No presentan una estructura cíclica como se puede encontrar en la mayoría de las micotoxinas. Bajo condiciones alcalinas, los grupos del ácido tricarbóxico se rompen, convirtiéndose en la forma hidrolizada correspondiente. Debido a que son hidrosolubles hay pocas probabilidades de acumulación de fumonisinas en tejidos animales, por lo cual se han encontrado cantidades realmente insignificantes en huevo, leche y carne (Uribe, 2015).

Mecanismo de acción

Las fumonisinas se parecen estructuralmente a la esfingosina en el alcohol terminal polihídrico y su mecanismo de acción es mediado por la inhibición de la ceramida sintasa siendo una enzima clave que interrumpe el metabolismo de los esfingolípidos en células, tejidos, hepatocitos, neuronas y células renales (Figura 5). La síntesis de esfingolípidos ocurre en el retículo endoplásmico. Este mecanismo afecta la actividad de proteínas quinasas en la diferenciación celular, crecimiento celular, apoptosis y carcinogenicidad. (Uribe, 2015). La gran homología de las fumonisinas con los esfingolípidos determina que el mecanismo de acción se base en la inhibición competitiva de la enzima ceramida sintasa. Esta disrupción provoca la perturbación del metabolismo de la ceramida y los esfingolípidos. La consecuencia inmediata de esta inhibición es la acumulación de la base esfingoidea que funciona como sustrato, la esfinganina (Sa) y en menor grado de la esfingosina (So), provocando toxicidad celular e inhibición del crecimiento. Los esfingolípidos pueden actuar como primeros y segundos mensajeros en una variedad de vías de señalización, y tienen una función vital en la formación de microdominios de membrana denominados *rafts* lipídicos (Futerman, 2004). Desde el punto de vista bioquímico, el más simple de los esfingolípidos es la ceramida, la cual funciona como molécula clave en la señalización celular y como precursora de esfingolípidos más complejos los cuales se degradan

gradualmente a ceramida que a su vez es degradada por una familia de ceramidasa para regenerar bases esfingoides, las cuales sirven como sustrato para esfingosinas quinasa que forman S1P (esfingosina-1-fosfato) (Voss, 2013 y Futerman, 2004).

Los riñones y el hígado son los principales órganos blancos, aunque se han observado variaciones en función de la especie, dosis y sexo (Uribe, 2015 y Wang, 1999).

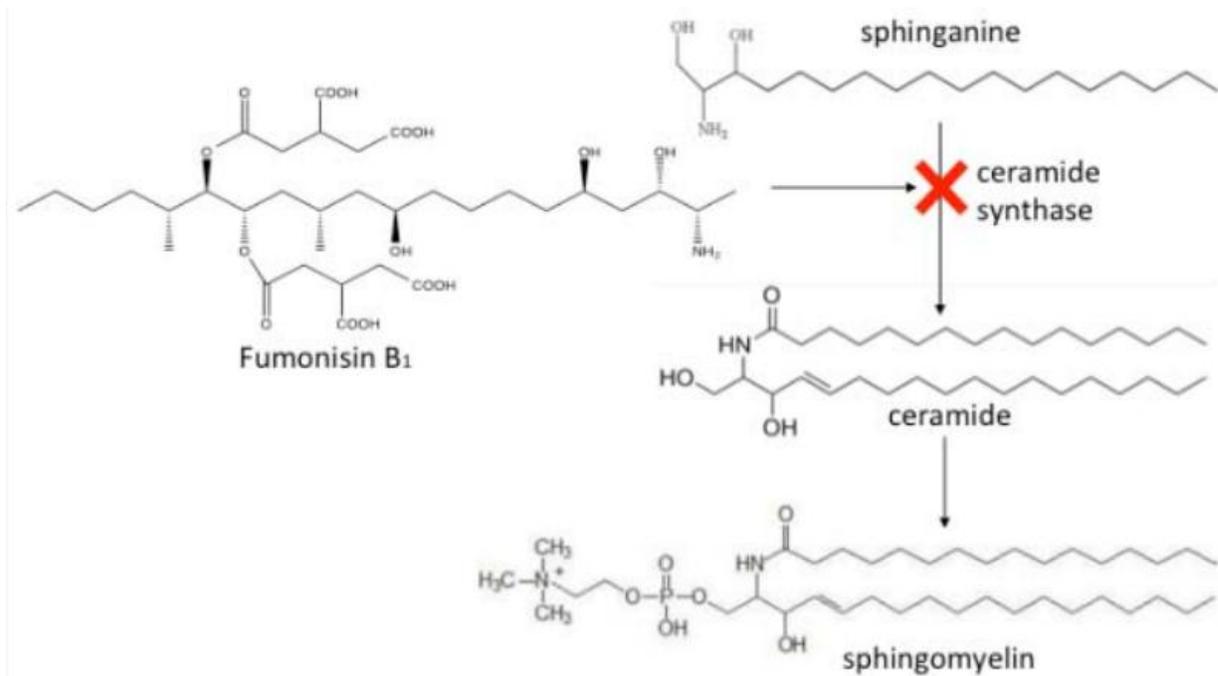


Figura 5. Representación de la inhibición de la ceramida sintasa por FB1 que permite la acumulación de esfingosina (Deepa, 2017).

Efectos en diversas especies.

Las fumonisinas afectan a los animales de diferentes maneras, interfiriendo con el mecanismo de esfingolípidos. Los principales síndromes que produce son neurotóxicos, nefrotóxico, hepatotóxicos y lesiones cardiacas. Produce leucoencefalomalacia en equinos y conejos, edema pulmonar e hidrotórax en cerdos y tiene efectos hepatotóxicos y carcinogénicos así como apoptosis en hígado de rata.

El HFB1, producto de la hidrólisis de FB1, a diferencia de FB1, no provoca defectos del tubo neural en un modelo de ratón y solo afecta ligeramente el metabolismo de los esfingolípidos (Voss, 2007); sin embargo, FB1 fue neurotóxico en carpas jóvenes, lo que indica que la micotoxina es permeable a la barrera sanguínea cerebral. Además, FB1 indujo genotoxicidad mediada por estrés oxidativo en cultivos celulares de ratas (Scott, 2012).

Los signos clínicos asociados con la ingesta de FB1 en pollos de engorda incluyen: disminución del consumo alimenticio, decremento en la ganancia de peso, parvadas con pesos desiguales, diarrea, enteritis catarral y raquitismo (Morales, 2017; Brugère-Picoux, 2015 y Gimeno, 2013).

En las lesiones macroscópicas se observa un aumento en el tamaño de hígado, riñones, páncreas, proventrículo y molleja; así como depleción y atrofia de órganos linfoides (Morales, 2017).

La ocurrencia de fumonisina está relacionada también con la alta incidencia de cáncer esofágico en Transkei (Sudáfrica), China y noreste de Italia (Bennett, 2003).

Fumonisinas	Todas las especies	Lesiones hepáticas en cerdos y vacas, leucoencefalomalacia equina (ELEM), Edema Pulmonar Porcino (PPE)
--------------------	---------------------------	---

Cuadro 2. Resumen de efectos de la fumonisina en animales (Uribe, 2015)

Cultivo celular

Se le llama cultivo celular a la propagación de células fuera del organismo de origen. Su utilidad es múltiple y dentro de sus ventajas encontramos las siguientes:

- a) Fácil manipulación bajo condiciones controladas
- b) Alternativa al uso de animales
- c) Permite trabajar en pequeña, mediana y gran escala
- d) Las células pueden mantenerse congeladas por largos períodos de tiempo con mínima pérdida de viabilidad

e) Menor variabilidad debido a que se tiene un cultivo de un linaje celular definido

f) Fácil acceso a múltiples líneas celulares en bancos internacionales

En un cultivo celular las interacciones célula-célula y célula-matriz no son las mismas que ocurren en un organismo vivo, hay menor heterogeneidad, se pierde la arquitectura tridimensional y no están los mismos estímulos hormonales y nutricionales. Sin embargo, este cambio de microambiente que puede estar influenciado por la naturaleza del sustrato (sólido, semisólido o líquido), el contacto con otras células, la constitución del medio y la temperatura favorece la migración, expansión y proliferación de células no especializadas, y no la expresión de funciones diferenciadas (Beltrán, 2016).

La mayoría de las células en cultivo, provenientes de tejidos sólidos, crecen en monocapa, adheridas a una superficie, y después de subcultivar (transferir células de un recipiente de cultivo a otro), requieren volver a adherirse al sustrato antes de proliferar. Además de la adhesión a la superficie, las células epiteliales son muy dependientes de las adhesiones intercelulares, por ello, crecen en parches cuando son subcultivadas a baja densidad, pues les permite formar uniones célula-célula (Beltrán, 2016).

Características: Citoesqueleto.

Otro componente importante en las adhesiones intercelulares y célula-sustrato, es el citoesqueleto, un sistema complejo de filamentos que se distribuyen dentro de la célula, proporciona un armazón estructural para la célula que le permiten su organización espacial y propiedades mecánicas. Dependiendo de su interacción con el medio ambiente participan en el cambio de la forma, migración celular, rearrreglos internos y desplazamiento de componentes celulares de un lugar a otro de la propia célula, que le permitan responder a los estímulos que recibe, así como en procesos de endocitosis, fagocitosis y citocinesis (Alberts et al., 2015).

Filamentos de actina

El citoesqueleto está conformado por tres tipos de filamentos proteicos: los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios. Los filamentos de actina están formados por la actina, proteína globular que polimeriza formando dos protofilamentos que se entrelazan en forma helicoidal para formar el filamento de actina de aproximadamente 7 a 8 nm de diámetro. Sus funciones están relacionadas con dar la forma a la célula y el movimiento (morfogénesis, migración, transporte intracelular, endocitosis, fagocitosis, anillo contráctil durante la división celular y contracción muscular). La más importante función de los filamentos de actina es producir la fuerza para realizar las funciones mencionadas (Fig. 6) (Roblero, 2016).

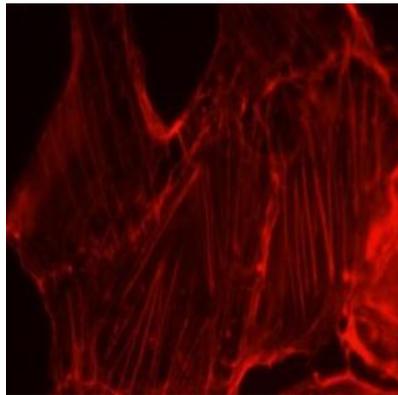


Figura 6. Filamentos de actina de células RK13 identificados con faloidina rodaminada. (Laboratorio 4, UIM FESC).

Lamelipodio

El lamelipodio puede definirse como una extensión aplanada de la membrana plasmática constituida principalmente por una gran cantidad de filamentos de actina orientados con su extremo “+” en dirección de la protrusión. El lamelipodio está conformado por diferentes regiones, en el borde frontal se forma una banda delgada de menos de 0.5 μm de espesor y de 1 a 10 μm de largo con extensiones cilíndricas (filopodios), detrás de esta región está una zona de mayor espesor denominada lámina. Atrás de la lámina está el cuerpo de la célula que incluye al núcleo y la mayoría

de los organelos. Los lamelipodios tienen ciclos de formación y retracción (Fig. 7) (Alberts et al., 2015; Cooper and Hausman, 2009 y Cramer LP, 1997).

Cuando las células migran se polarizan, es decir, los dos polos de la célula tienen características estructurales y funcionales diferentes. En uno de los polos (en la parte anterior) se forma una extensión aplanada de la membrana plasmática que dirige el avance de la célula, mientras que el otro polo (posterior), es una zona de contracción para el desplazamiento de la célula, este tipo de movimiento se conoce como amiboideo y podemos compararlo con el movimiento de un caracol, el cual al avanzar desplaza su cabeza hacia adelante y la fija al suelo (esto equivale al lamelipodio de la célula) y después mueve su concha hacia adelante para avanzar (corresponde al polo contráctil posterior de la célula). Así durante el movimiento ameboideo se distinguen tres fases: protrusión (formación del lamelipodio), adhesión (fijación del lamelipodio al sustrato) y contracción (retracción del polo posterior para desplazarse hacia adelante) (Alberts et al., 2015; Pollard y Earnshaw, 2008).

Filopodios

Son protrusiones altamente dinámicas de la membrana plasmática sustentadas por haces paralelos de filamentos de actina con el extremo “+” dirigido al extremo del filopodio. Al igual que los lamelipodios, los filopodios dependen de ciclos de polimerización y despolimerización de los filamentos de actina y también se caracterizan por fases de formación y retracción (25 $\mu\text{m}/\text{min}$) (Fig. 7) (Alberts et al., 2015; Roy and Kornberg, 2015; Cooper and Hausman, 2009).

Los filopodios se pueden encontrar emergiendo de cualquier sitio de la superficie celular y también se localizan en el borde libre de los lamelipodios (migración celular, expansión radial y conos de crecimiento). Pueden emitirse de forma individual o en gran número, incluso por todo el perímetro de la célula. Los filopodios actúan para explorar el microambiente, incluyendo la matriz extracelular y las características de otras células, por lo que se reconocen como sensores del microambiente. La atracción o repulsión al darse la interacción de una célula con un blanco es por el contacto inicial de un filopodio (Heckman and Plummer, 2013; Passey et al., 2004).

Dado que los filopodios median el reconocimiento de los componentes de la matriz extracelular son clasificados como sensores basados en actina y esta función depende de la rigidez de los haces de filamentos de actina que forman el núcleo de los filopodios. Otra función de los filopodios es el transporte de moléculas mediada por miosina, tales como los componentes de las adhesiones focales que pueden alcanzar el extremo del filopodio y establecer la adhesión al sustrato. Asimismo están relacionados con la presentación de antígenos (Roy and Kornberg, 2015; Heckman and Plummer, 2013).

Corteza Celular

Al observar al microscopio de fluorescencia células marcadas con la faloidina rodaminada, se puede observar en muchas de ellas el perímetro engrosado (la marca roja que indica la presencia de filamentos de actina), esto corresponde a la corteza celular (Fig. 7). (Cooper and Hausman, 2009 y Alberts et al., 2015)

La corteza celular forma el perímetro de la célula y está conformada por una red de filamentos de actina unidos a la membrana plasmática. Cabe señalar que estos filamentos están asociados a una proteína motora, la miosina, lo que le permite a la corteza la capacidad de contraerse y de esta forma tensar la red de filamentos y hacerla más resistente para fortalecer a la membrana plasmática contra fuerzas de presión externas. La corteza celular es una estructura dinámica, que puede sufrir rearrreglos estructurales y alteraciones en la unión de la actina a la membrana cambiando así sus propiedades elásticas. Es posible encontrar regiones de la membrana (llamados dominios de membrana) en las cuales los filamentos de actina están unidos a la membrana y otras regiones en donde no existe esta unión.

Los dominios en donde los filamentos de actina se unen fuertemente a la membrana forman una corteza más rígida y aquellos en donde no se establece esta unión la corteza es elástica. En la región donde se forman los lamelipodios, hay rearrreglos de la corteza celular y se presenta un dominio de membrana que permite cambios en la elasticidad de la misma y la formación de los lamelipodios. Esto podría suceder en cualquier célula cuando adopta diferentes formas, rearrreglos de la corteza celular con

alteración en la elasticidad de la membrana que permite que las células puedan adoptar diferentes formas (Alberts et al., 2015; Roubinet et al., 2012; Salbreux et al. 2012; Fehon et al., 2010; Cooper and Hausman, 2009).

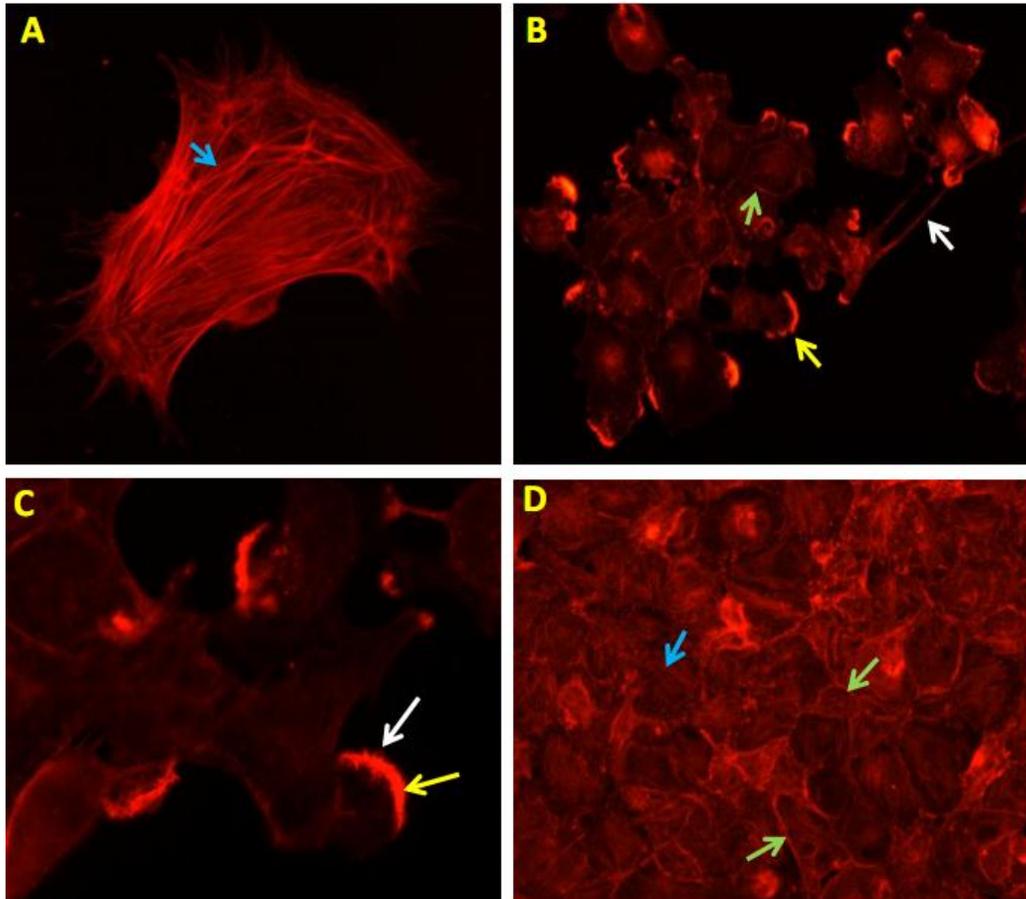


Figura 7. Células RK13 en las que se marcaron los filamentos de actina mediante la técnica de fluorescencia directa usando faloidina rodamina. Flecha azul: fibras de tensión. Flecha amarilla: lamelipodios. Flecha blanca: filopodios. Flecha verde: corteza celular. (Laboratorio 4, UIM FESC).

Fluorescencia directa

Estas estructuras pueden ser visualizadas en las células gracias a la técnica de fluorescencia directa en donde se usa la faloidina, toxina producida por el hongo *Amanita phalloides*, que se une a los filamentos de actina. La faloidina se conjuga con fluoresceína o rodamina y se aplica a las células previamente fijadas y permeabilizadas en las que la faloidina se une a los filamentos de actina y estos pueden ser visualizados utilizando un microscopio de fluorescencia que emite un haz

de luz que excita al fluorocromo y provoca la emisión de luz observable a través de los oculares del microscopio. Si la faloidina se conjugó con fluoresceína los filamentos se observarán de color verde y si se conjugó con rodamina se verán de color rojo (Figura 7) (Alberts et al., 2015).

Estudios AF y FB en cultivo celular

Con el fin de evaluar el riesgo tóxico de compuestos de las micotoxinas en humanos se pueden realizar estudios de toxicidad en animales. Sin embargo, debido al número de animales necesarios y por motivos éticos y científicos, se han establecido modelos *in vitro* que permiten trabajar con cultivos celulares y obtener datos de los efectos tóxicos del compuesto ensayado (García, 2014).

La coexistencia de la aflatoxina (AFB1) y la fumonisina (FB1) es ampliamente conocida en muchas partes del mundo (del Río García, 2007). En estudios *in vitro* con aflatoxinas empleando como modelo el intestino de pollo se ha observado que dosis de 1.25 a 5 mg/ kg de dieta no tienen efecto sobre la absorción de glucosa y metionina. Tampoco se observó efecto en la absorción de glucosa en modelos murinos expuestos a 5 ug de AFB1/ ml de buffer (Yunus, 2011). La AFB1 en concentración de 50 μ M afecta la morfología celular del epitelio intestinal porcino (IPEC-1) y a concentraciones de 1, 2 y 5 μ M en combinación con FB1 afecta la proliferación y produce daño celular (Del Río García, 2007). En ensayos *in vitro* la toxicidad de la aflatoxinas G1, B2 y G2 es aproximadamente 50, 20 y 10% de la que presenta la AFB1, respectivamente (Rodríguez, 2010). En modelos *in vivo* con pollos, la AFB1 en concentraciones de 2 ppm no incrementaron la permeabilidad gastrointestinal (Galarza, 2016).

La FB1 en concentraciones de 50, 100, 200 y 500 μ M, muy superiores a las reportadas en campo, alteran la morfología, proliferación y la función de barrera del IPEC-1 y por lo tanto la resistencia transepitelial eléctrica (Del Río, 2007 y Bouhet, 2003).

En líneas de cultivo celular como HT-29 derivada de cáncer de colon humano, concentraciones de 0.25 a 0.69 μM de FB1 ocasionó peroxidación lipídica a las 12 horas de exposición, seguido de una inhibición de la proliferación celular en concentraciones arriba de 8.6 μM (Minervini, 2014).

En estudios recientes *in vivo* se ha demostrado que 5mg de FB1 / kg de alimento tiene efecto sobre la respuesta inmune celular y las variables productivas del pollo de engorda. El consumo de alimento contaminado durante 35 días provocó inmunodepresión en las aves (Uribe, 2015).

Todos los estudios tienen una aportación importante sobre el mecanismo de lesión de ambas micotoxinas; sin embargo, es necesario evaluar la concentración encontrada actualmente en el campo, para conocer los efectos reales que estas micotoxinas pueden tener sobre parámetros de suma importancia como son la viabilidad celular, integridad celular, así como su efecto citotóxico.

JUSTIFICACIÓN

La FAO estima que el 25% de los cultivos del mundo se encuentran contaminados con micotoxinas. En Norteamérica-Centroamérica la frecuencia de Aflatoxinas y Fumonisinias varía de 2-76%.

Se ha reportado que las concentraciones de Aflatoxina que causan daño van desde 0.07-0.3 mg /kg, para FB1 van de 0.3 a más de 500 mg /kg. Sin embargo, estudios recientes muestran que en México los niveles de contaminación de Aflatoxinas en el campo son en promedio de 0.46 mg /kg y de FB1 van de 0.2 a 10 mg /kg. Los estudios *in vitro* realizados por diversos investigadores manejan concentraciones muy superiores a las que se encuentran en campo de ambas micotoxinas, por lo que es necesario conocer el efecto de las concentraciones encontradas a nivel de campo sobre modelos *in vitro*, con el fin de entender el mecanismo de lesión bajo el cual estas micotoxinas podrían alterar la integridad celular, específicamente de células de tejidos epiteliales, ya que son los epitelios los que en primera instancia se encuentran en contacto directo con las micotoxinas al ser ingeridas ya sea en animales o humanos, pues estos tienen una función de barrera ante agentes externos.

La finalidad de este estudio fue emplear concentraciones de dos micotoxinas (Fumonisinina B1 y Aflatoxina G2) actualmente encontradas en el campo y evaluar su efecto sobre los parámetros de viabilidad e integridad en células de epitelio de riñón de conejo (RK13) así como sobre la morfología celular y estructura del citoesqueleto.

HIPÓTESIS

Si las fumonisinas B1 y las aflatoxinas G2 son capaces de causar alteraciones sobre la estructura del citoesqueleto (filamentos de actina), entonces se verá afectada la permeabilidad, viabilidad e integridad celular, así como la morfología de células de riñón de conejo RK13.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de las fumonisinas (FB1) y aflatoxinas G₂ sobre la morfología, viabilidad e integridad (estructura de filamentos de actina y resistencia transepitelial) de células de la línea RK13 *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.** Conocer el efecto de aflatoxinas G₂ y fumonisinas B1 de forma individual sobre la morfología en cultivos de células RK13.
- 2.** Evaluar la lesión ocasionada por aflatoxinas G₂ y fumonisinas B1 en células de la línea RK13 mediante ensayos de viabilidad celular.
- 3.** Determinar la alteración de la estructura del citoesqueleto (filamentos de actina) y de la resistencia transepitelial eléctrica ocasionados por aflatoxina G₂ y fumonisina B1 para conocer el daño sobre la integridad de la barrera celular de células RK13.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados, se trabajó con cultivos celulares de células RK13 divididos en 2 grupos a los que se les aplicaron 3 tratamientos con tres repeticiones cada uno (Tabla 1) para la medición de los parámetros a evaluar.

Tabla 1. Tratamientos aplicados al cultivo celular RK13

Micotoxina	Concentración en (ppm) *	Concentración en (μ M)	Repetición
Fumonisina B ₁	3	4.15	1
			2
			3
	5	6.92	1
			2
			3
	10	13.85	1
			2
			3
Aflatoxina G ₂	0.05	0.069	1
			2
			3
	0.1	0.138	1
			2
			3
	0.2	0.276	1
			2
			3

*Concentraciones encontradas en campo reportadas por Gutiérrez (2017) y Biomin (2015).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, en los laboratorios:

Laboratorio 4: “Morfología Veterinaria y Biología Celular” y

Laboratorio 14 “Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis

Cultivo celular

Se estandarizó el cultivo de células RK13 (ATCC CCL-37, células de riñón de conejo de morfología epitelial) en el laboratorio. Las células se cultivaron en medio DMEM*, suplementado con suero fetal bovino* (SFB) al 7%, adicionado con antibióticos penicilina*, 5000 UI y estreptomycin*, 5 µg/ml. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad (Roblero, 2016).

* Laboratorio 4 UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México

Micotoxinas

Se trabajó con Fumonisina B₁ (FB1) (Sigma Aldrich Fumonisin B₁ from *Fusarium moniliforme*, Product No. F1147, Saint Louis, USA) en presentación polvo (liofilizada) de 5 mg con peso molecular 721.83 g/mol [C₃₄H₅₉NO₁₅], la cual se diluyó en 5 ml de agua destilada estéril para tener una concentración madre de 3610 µM. A partir de la concentración madre de Fumonisina se prepararon las concentraciones propuestas para experimentar (4.15 µM, 6.92 µM y 13.85 µM) 3, 5 y 10 ppm, respectivamente.

La aflatoxina G₂ cristalina (Sigma Aldrich, Product No. A0263, Saint Louis, USA) presentación de 10 mg, con un peso molecular de 330.30 g/mol [C₁₇H₁₄O₇]. Se utilizó metanol para preparar la solución madre de 10,000 ppm, posteriormente se diluyó en medio de cultivo a las concentraciones establecidas para el experimento (0.069 µM, 0.138 µM y 0.276 µM) 0.05, 0.1 y 0.2 ppm, respectivamente (Del Río, 2007; Bouhet, 2006 y Bouhet, 2003).



Figura 8 .Micotoxinas Aflatoxina G2 y Fumonisin B1

Para la aplicación de los tratamientos, primero se descartó el efecto de los vehículos de las micotoxinas sobre el cultivo celular en los volúmenes en los que se encuentran presentes en cada una de las concentraciones a emplear, para así garantizar que los efectos encontrados se debieran a la micotoxina y no a sus vehículos.

Morfología celular

Para la evaluación morfológica se realizó la siembra de células RK-13 a razón de 6×10^6 células / ml en cada pozo en Micro placas de 24 pocillos (Costar®, Corning, Laboratorio 4 UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) (área: 2 cm²), para el conteo celular se empleó el equipo TC20 Automated Cell Counter de Bio-Rad (Biorad, Laboratorio 4 UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) (Figura 9); una vez formada la monocapa con una confluencia del 100% (48 horas), se aplicaron los tratamientos, a las concentraciones previamente mencionadas. Los cultivos celulares se observaron y fotografiaron en un microscopio UNICO AC 110 VIN (Laboratorio 4 UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) a las 24 y 48 horas post inoculación de las micotoxinas (Figura 12) (Del Río, 2007 y Bouhet, 2003).



Figura 9. TC20 Automated Cell Counter

En las figuras 10 y 11, se muestra la distribución de las placas, una para Fumonisina B1 y la otra para Aflatoxina G2, en cada placa se manejaron los controles de medio para descartar cualquier tipo de contaminación, así como de cultivo para comparar con los pozos tratados.

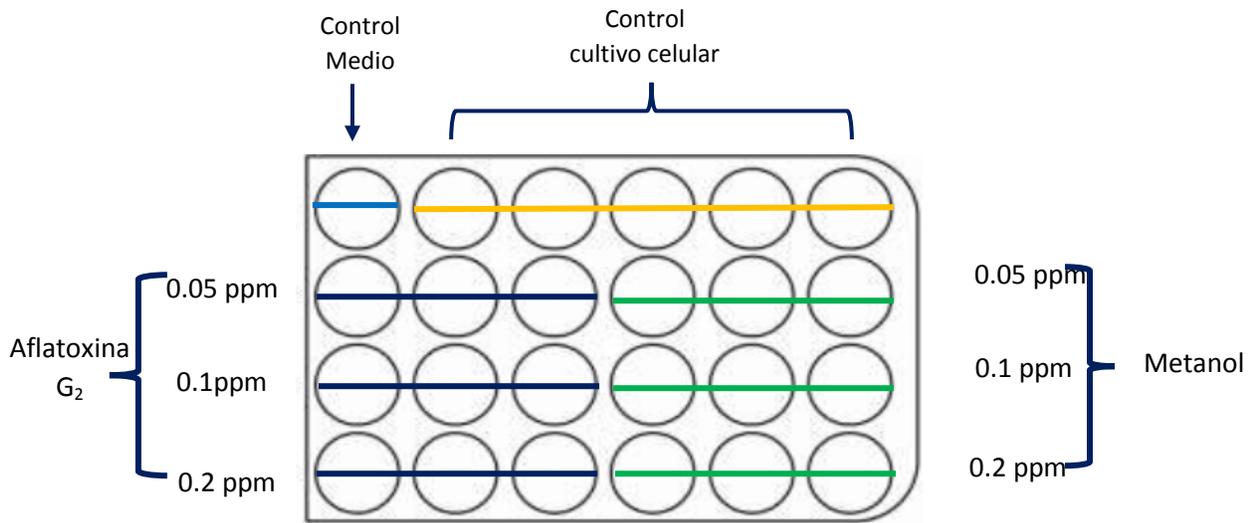


Figura 10. Distribución de microplaca para Aflatoxina G2.

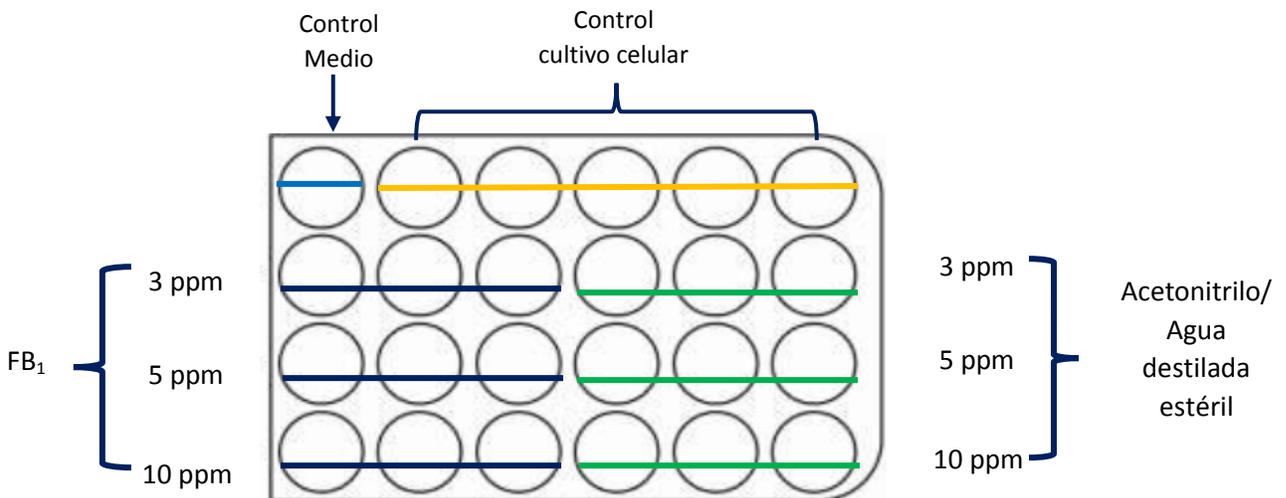


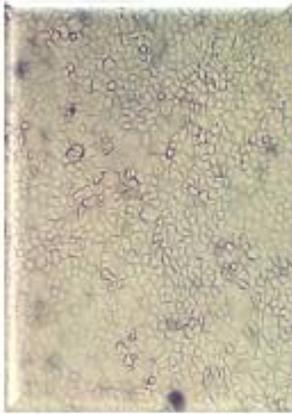
Figura 11. Distribución de microplaca para Fumonisina B1



Medio DMEM+ suero fetal
bovino 7% penicilina, 5000 UI
y estreptomycin, 5 µg/ml



Incubadora @ 37°C,
atmósfera 5 % CO₂ , H=95%



Confluencia 100%



Cambio de medio



Aplicación de micotoxinas



Observación al microscopio a
las 24 y 48 h post
inoculación.

Figura 12. Esquema de evaluación morfológica de células RK13

Viabilidad celular (MTT)

El efecto sobre la viabilidad fue evaluado a través de la determinación de la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma-Aldrich, Product No. M5655, Saint Louis, USA), realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán), que permite determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de formazán producido es proporcional a la cantidad de células vivas.

Una vez transcurridas las 48 horas post inoculación del cultivo con las micotoxinas, se expusieron las células a la solución de MTT (0.5 mg / ml) en cada pocillo, se dejaron incubar en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ a 37° C durante 3 horas. Finalmente, la intensidad del producto se analizó mediante espectrofotometría a 595 nm en un lector de microplacas BioRad® modelo 550 (Laboratorio 4, UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) (Figura 13) (Jardón, 2018 y Bouhet, 2003).



Figura 13. Lector de Microplacas BIO-RAD Modelo 550.

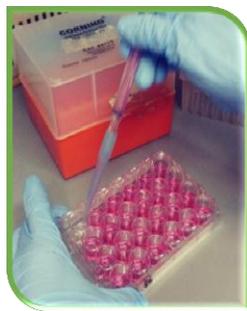
Evaluación del citoesqueleto de actina

Para visualizar los filamentos de actina, se aplicó la técnica de fluorescencia directa con faloidina conjugada a rodamina (Figura 14). Una vez pasadas las 48 horas de exposición del cultivo a las concentraciones de micotoxinas anteriormente mencionadas, las células crecidas en cubreobjetos se fijaron con formalina acuosa al

10% (Laboratorio 4, UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) en un amortiguador salino de fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) durante 20 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% (Laboratorio 4, UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) en PBS por 5 min. Para reducir la unión no específica, las células se bloquearon con albúmina de suero bovino al 1% (Laboratorio 4, UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) por 20 minutos. Después de cada paso las células se lavaron con PBS. Las células se incubaron con faloidina conjugada a rodamina por 20 min. Después se realizaron 3 lavados con PBS y un lavado con agua desionizada y se montaron los cubreobjetos sobre portaobjetos empleando medio de montaje. Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia (VELAB MICROSCOPE VE-146YT, Laboratorio 14, UIM FESC, Cuautitlán Izcalli, México) (Jardón, 2018).



Pozos c/ cubreobjetos



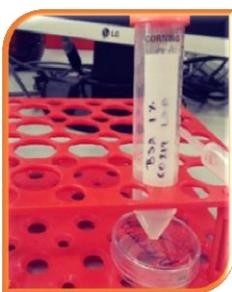
Eliminación de medio



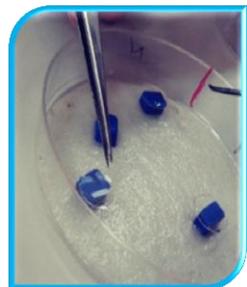
Fijación c/formalina



Permeabilización c/ Tritón X-100 al 50% en PBS 5 min



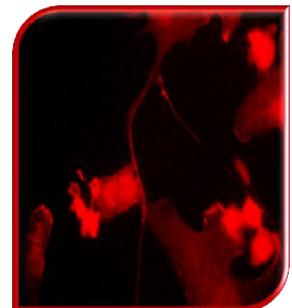
Bloqueo c/ albúmina sérica al 10% 20 min.



Incubación c/ faloidina rodaminada 20 min



Montaje de cubres sobre portaobjetos



Observación en microscopio de fluorescencia directa

Figura 14. Esquema del proceso de tinción de los filamentos de actina.

Medición de la Resistencia Transepitelial Eléctrica (TEER).

Para la evaluación de la TEER, primero se estandarizó el procedimiento con las células RK13, a fin de determinar las condiciones óptimas para desarrollar el experimento.

El procedimiento estandarizado consiste en cultivar las células RK13 a una densidad de 1.5×10^5 células en insertos de membrana de tereftalato de polietileno de 0.6 cm^2 (Figura 15) con un tamaño de poro de $0.4 \mu\text{m}$ (Merck Millipore, No. Cat. PIHP01250, Darmstadt, Germany) en medio de cultivo, una vez alcanzada la confluencia del 100%, las células son tratadas con $4.15 \mu\text{M}$, $6.92 \mu\text{M}$ y $13.85 \mu\text{M}$ de FB_1 , así como $0.069 \mu\text{M}$, $0.138 \mu\text{M}$ y $0.276 \mu\text{M}$ de AFG_2 . La TEER se midió durante 15 días con un Voltímetro Millicell ERS-2 Millipore (No. Cat MERS00002, Millipore Corporation. Billerica, MA, U.S.A.). Los valores de TEER fueron reportados como $\Omega \times \text{cm}^2$ (Pinton, 2009 y Bouhet, 2003).



Figura 15. Insertos transwell 0.6 cm^2

En la figura 16, se muestra el Voltímetro y los pasos para realizar la medición de la TEER respectivamente. El equipo se dejó cargar 8-10 horas previo a su utilización. Antes de realizar la medición, se revisó y calibró el equipo con el interruptor en Omhs, una vez que el display marcó 1000 el voltímetro estuvo listo para usarse. Los electrodos se esterilizaron previamente por un periodo de 15 minutos con alcohol al 70%. La medición se hizo sumergiendo los electrodos en el pozo transwell, con el electrodo corto al interior del inserto, sin tocar el fondo, y el extremo largo afuera. La lectura se hizo en un ángulo de 90° y se registraron los valores del display (Manual Millicell ERS-2, 2016).



Carga de equipo



Calibración de Voltímetro
(Ohms)



Esterilización electrodos



Medición de Resistencia

Figura 16. Esquema de medición de TEER.

Análisis estadístico

Los datos fueron evaluados con un análisis de la varianza (ANOVA), la comparación de medias se realizó según la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico Statgraphics plus 5.0. El valor de significancia fue del 95% ($\alpha = 0.05$) para distinguir la diferencia entre los tratamientos.

RESULTADOS

Morfología

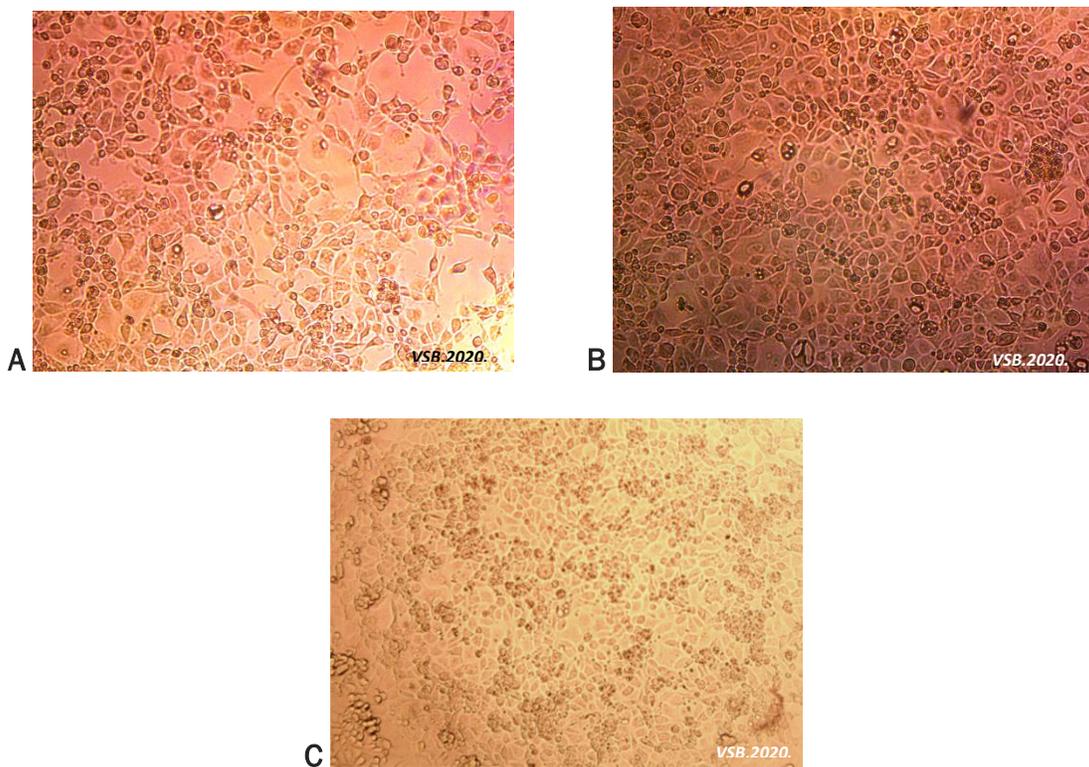


Figura 17. Cultivo celular Rk13 con diferentes estados de confluencia. A Cultivo en crecimiento 30% confluyente. B Cultivo en crecimiento 70% confluyente. C. Cultivo con monocapa formada, 100% confluyente.

En la figura 17, se aprecia la morfología característica de la línea, la cual presenta una monocapa uniforme con células en forma de polígonos irregulares, se observa un sobre crecimiento representado por los cúmulos de células dispersos sobre la monocapa (Figura 17 C). El crecimiento celular se da de la periferia hacia el centro.

Para la aplicación de los tratamientos, primero se descartó el efecto de los vehículos de las micotoxinas sobre el cultivo celular, evaluados en las concentraciones en las que se encuentran presentes en cada uno de los tratamientos a empleados.

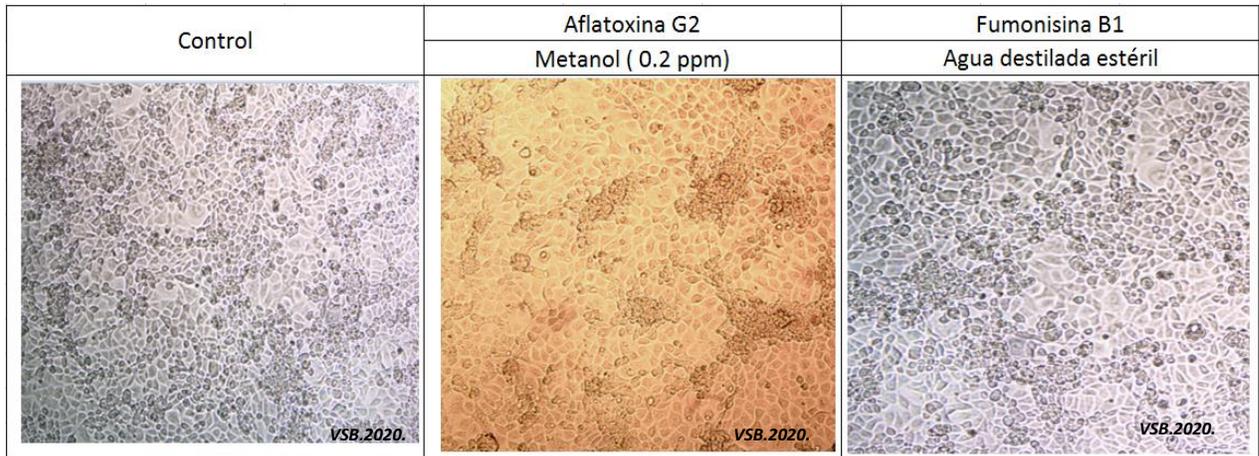


Figura 18 .Efecto de las concentraciones más elevadas de los vehículos sobre cultivo celular

En la figura 18, se muestra el efecto de los vehículos de las micotoxinas empleados a la concentración más elevada de cada micotoxina tras 48 horas de exposición. Se observa que ambos vehículos no tuvieron efecto sobre la morfología del cultivo celular.

Morfología de las células tratadas con Aflatoxina G2 y Fumonisina B1.

En la figura 20 se muestran los cultivos celulares expuestos por 48 horas a las dos micotoxinas con sus respectivas concentraciones a evaluar, la figura 19 muestra un cultivo control para la comparación de los grupos tratados.

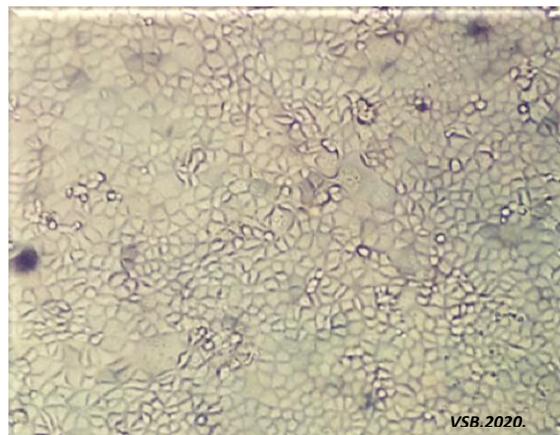


Figura 19. Cultivo control de RK13

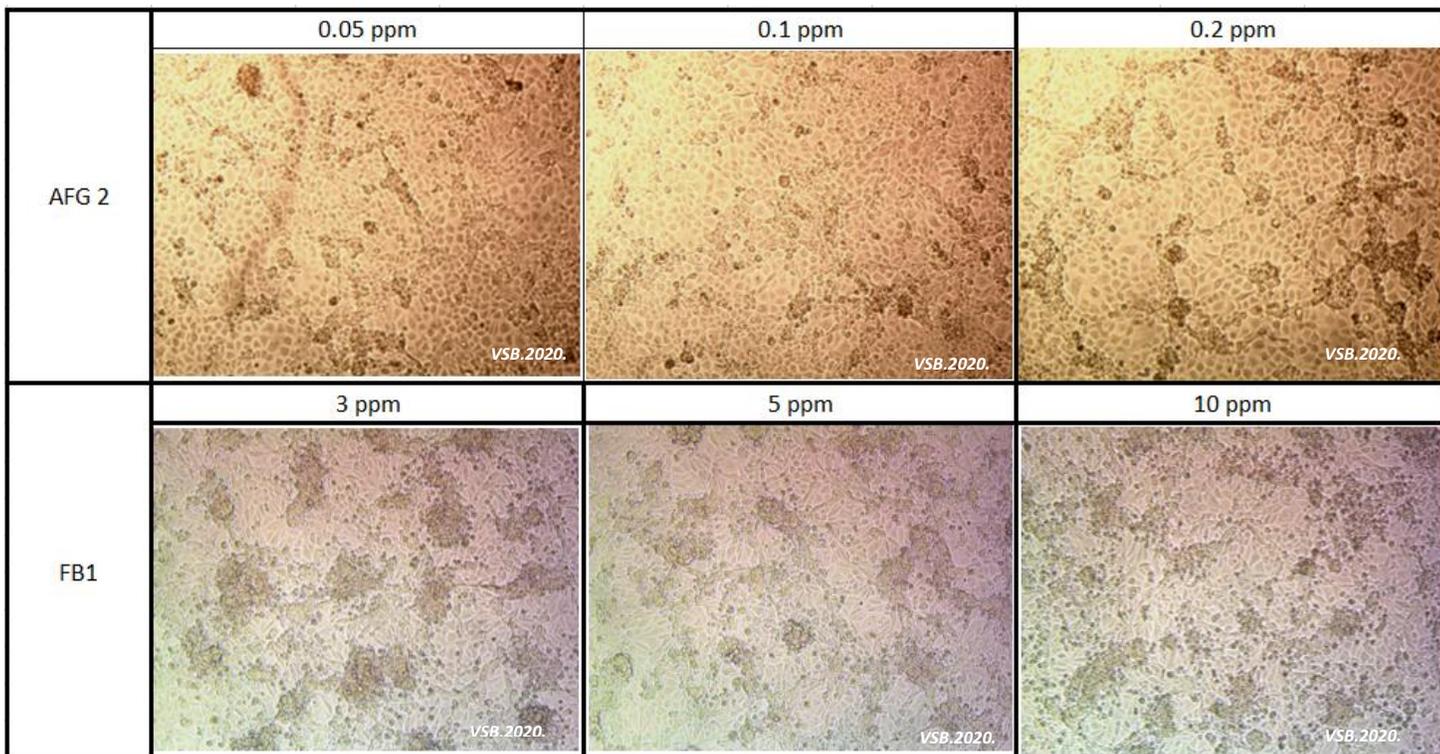


Figura 20. Efecto en RK13 tras 48 h de exposición a micotoxinas.

Como se muestra en la figura 20 aparentemente se mantiene la estructura de la monocapa en todos los casos así como la forma de polígonos irregulares de las células, sin embargo es notable la presencia de detritos celulares en ambos tratamientos al ser comparados con un cultivo sin tratar (Figura 19), siendo más evidente en Fumonisina B1; notándose así un efecto de ambas micotoxinas sobre las células RK13, siendo mayor el de FB1 que el de AFG2.

Viabilidad celular (MTT).

El mayor grado de lesión celular ($p < 0.05$) se dio en las concentraciones de 5 y 10 ppm de FB1, la viabilidad celular con 3 ppm de FB1 no fue diferente a la del testigo (Figura 21).

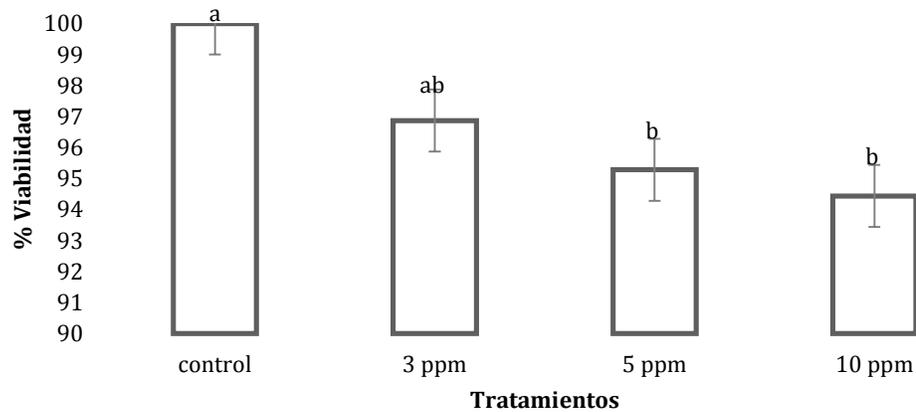


Figura 21. Efecto de FB1 sobre la viabilidad de RK13. Los datos son expresados como porcentaje de viabilidad, $n=45$. Literales diferentes muestran diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

La viabilidad celular se reduce al aumentar la concentración de aflatoxina G2 en el cultivo, como se muestra en la figura 22. Estadísticamente, se tuvo diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el grupo control y las concentraciones de 0.1 y 0.2 ppm, así como diferencias entre los tratamientos de 0.05 y 0.2 ppm de aflatoxina G2 (Figura 22).

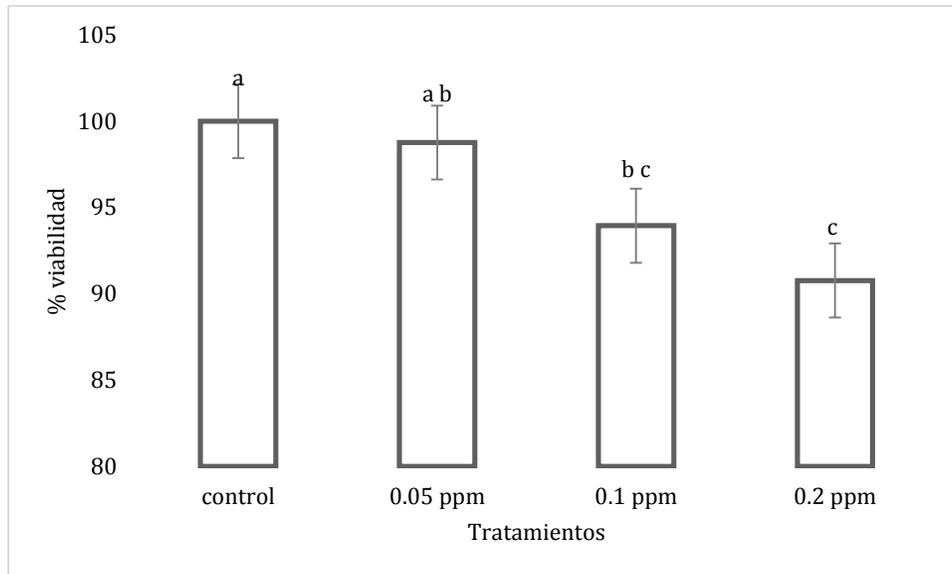


Figura 22. Efecto de AFG2 sobre la viabilidad de RK13. Los datos son expresados como porcentaje de viabilidad. $n=45$. Literales diferentes muestran significancia estadística ($p<0.05$).

Evaluación del citoesqueleto de actina

La evaluación del daño a citoesqueleto por efecto de las micotoxinas se realizó por duplicado para cada concentración. La FB1 provocó mayor lesión en las concentraciones de $6.92 \mu\text{M}$ y $13.85 \mu\text{M}$ (5 y 10 ppm, respectivamente), las células presentan fragmentos de monocapa con lisis e inhibición del crecimiento celular en esas áreas del cultivo. Se aprecia una disminución en el grosor de la corteza celular en los 3 tratamientos evaluados, siendo más notorio en las concentraciones de 5 y 10 ppm. No se encontraron filopodios o lamelipodios en las células tratadas con las 3 concentraciones (Figura 23).

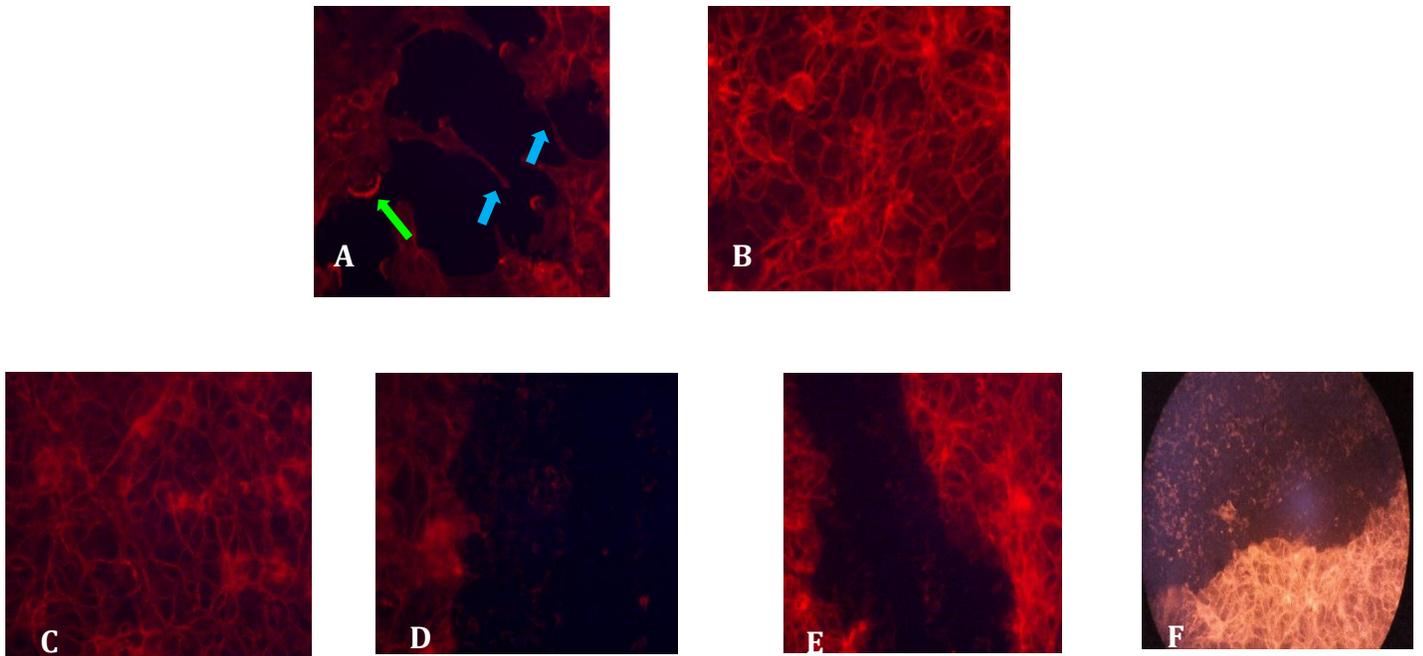


Figura 23. Cultivos de RK13 con filamentos de actina marcados con faloidina conjugada a rodamina expuestos 48 horas a FB1 . (A) Cultivo sano en crecimiento con 70 % confluencia. Flechas azules (→) señalan filopodios, flechas verdes (→) lamelipodios. (B) Monocapa sana y completamente desarrollada, se aprecian los filamentos de actina en rojo y la delimitación de cada célula por éstos. (C) Cultivo expuesto a 3 ppm, con notoria disminución en grosor de corteza celular (D) y (E) Cultivo tratado con 5 y 10 ppm respectivamente, ambos con fragmentación de monocapa. (F) Cultivo con 10 ppm de FB1 se observa destrucción de monocapa así como fragmentos de células lesionadas.

No se apreciaron cambios sobre la estructura del citoesqueleto (Figura 24) con ninguna de las 3 concentraciones de aflatoxina G2 en comparación con el cultivo control (Figura 23 B). No se observaron filopodios o lamelipodios en ninguna de las 3 concentraciones de AFG2.

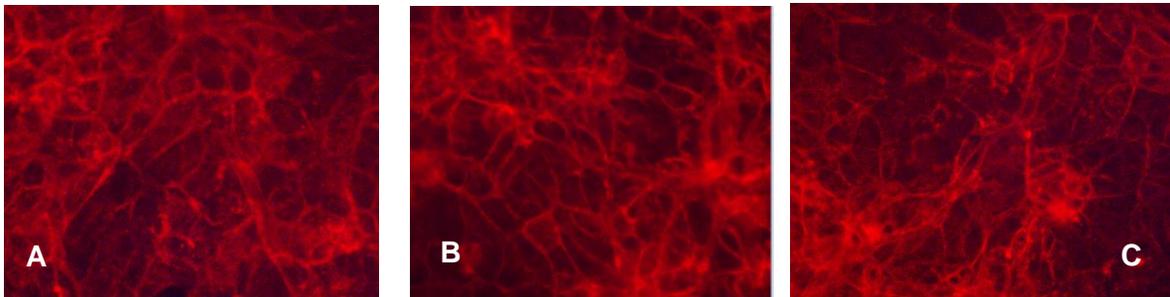


Figura 24. Cultivos de RK13 con filamentos de actina marcados con faloidina rodaminada expuestos a AFG2 48 h. A Cultivo expuesto a 0.05 ppm. B Cultivo expuesto a 0.1 ppm. C Cultivo expuesto a 0.2 ppm de AFG2.

Medición de la Resistencia Transepitelial Eléctrica (TEER).

En la figura 25 se presenta la TEER de células Rk13 sin tratar, a las cuales se les realizó un cambio de medio cada 48 horas por un periodo de 15 días.

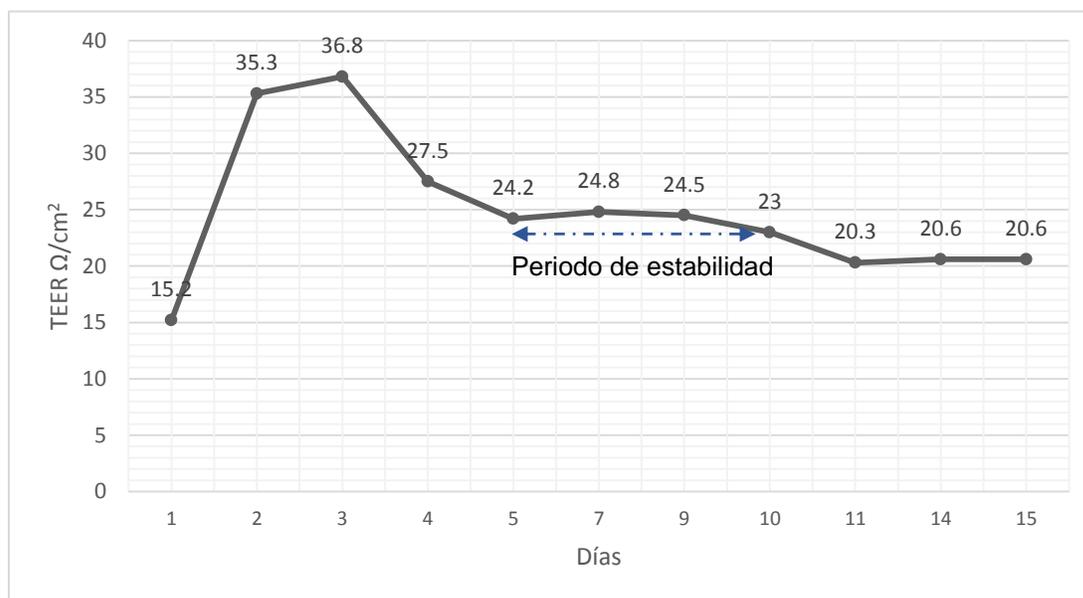


Figura 25. Comportamiento de cultivo RK13 durante estandarización para medición de resistencia transepitelial.

Durante la estandarización, se observó estabilidad en los valores de resistencia en el periodo del día 5 al 10. En el cultivo de RK13 sin tratamiento, la resistencia puede medirse hasta por 21 días, obteniendo valores mínimos de hasta $0.12 \Omega \times \text{cm}^2$, sin embargo, a partir del día 15 los valores de resistencia presentan grandes variaciones.

La aplicación de las micotoxinas se realizó cuando el cultivo alcanzó una confluencia del 100%, posteriormente se realizó el cambio de medio de mantenimiento cada 48 horas el cual contenía también las micotoxinas a las concentraciones de 3, 5 y 10 ppm para FB1 y 0.05, 0.1 y 0.2 ppm para AFG2.

Se observó reducción del TEER cuando se añadió FB1 dependiente de tiempo y dosis. Después de 48 horas de exposición a los tratamientos, las células presentaron una disminución considerable con respecto al cultivo control del -51% para 5ppm, -31% para 10 ppm y del -12% para 3 ppm. Al final del experimento, la TEER disminuyó -98, -96 y -64% para las células tratadas con 10, 5 y 3 ppm respectivamente (Figura 26). La medición se realizó por 10 días, lapso en el que se pudo realizar la medición de la TEER ya que ésta disminuyó casi hasta cero.

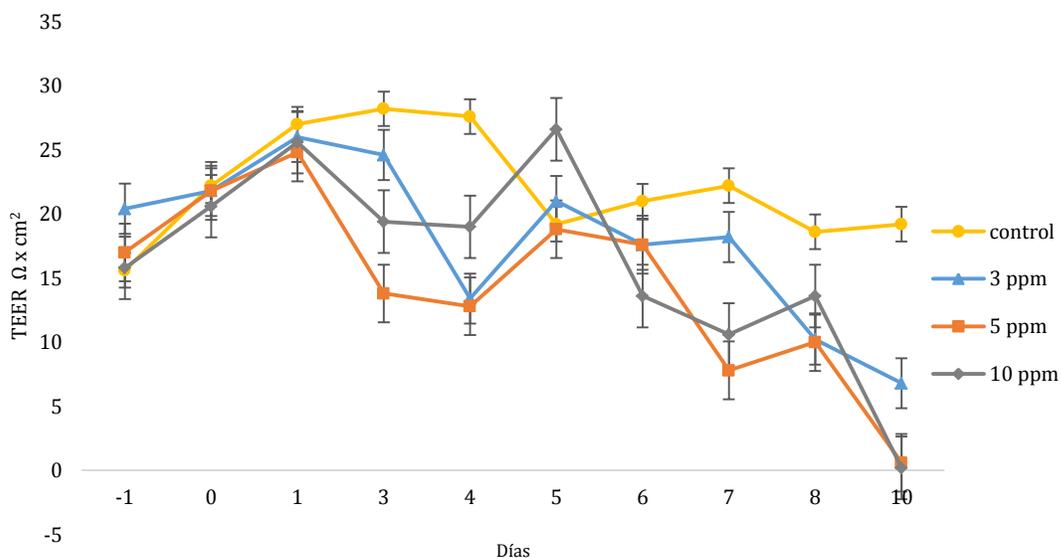


Figura 26. Efecto de FB1 sobre la resistencia transepitelial eléctrica (TEER) sobre la monocapa epitelial de RK13. Las células fueron crecidas en insertos transwell, el día 0 se hizo la aplicación de las diferentes concentraciones de FB1. Células sin tratar (●), insertos tratados con 3 (Δ), 5 (◻) y 10 (◆) ppm de FB1. Los valores del TEER son expresados como $\Omega \times \text{cm}^2$

Para graficar el comportamiento de cada una de las concentraciones empleadas (3, 5 y 10 ppm) se aplicaron líneas de tendencia polinómica de segundo orden, es decir, las sugeridas en el estadístico ($Y=c + bx + ax^2$) (Figura 27), acuerdo con los valores de R^2

de cada ecuación, el 70% de la variación de la TEER se debe a la concentración empleada.

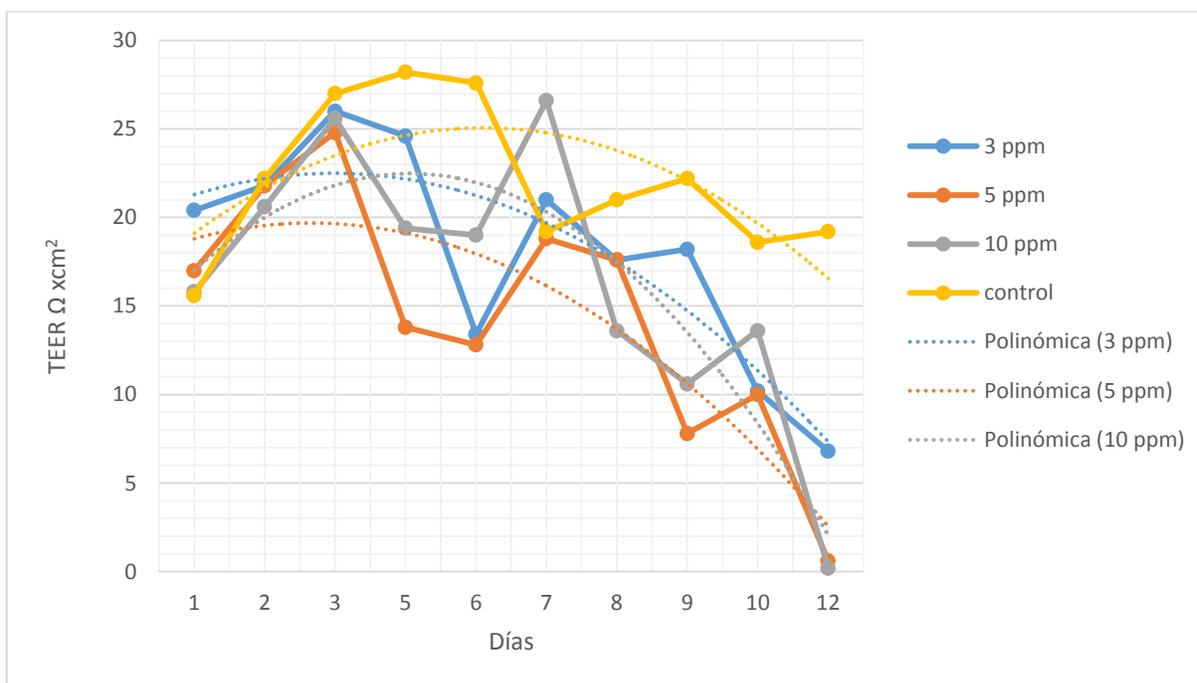


Figura 27. Líneas de tendencia y ecuaciones que representan el comportamiento del TEER de cada una de las concentraciones de FB1 en cultivos RK13.

Se observó reducción del TEER en las células tratadas con AFG2, dependiente de tiempo y dosis, la cual no fue tan intensa como en la FB1, ya que los valores de TEER fueron muy cercanos a los del grupo control después de 10 días de aplicación al cultivo la mayor disminución fue del 1.05% para las células tratadas con 0.1 ppm (Figura 28).

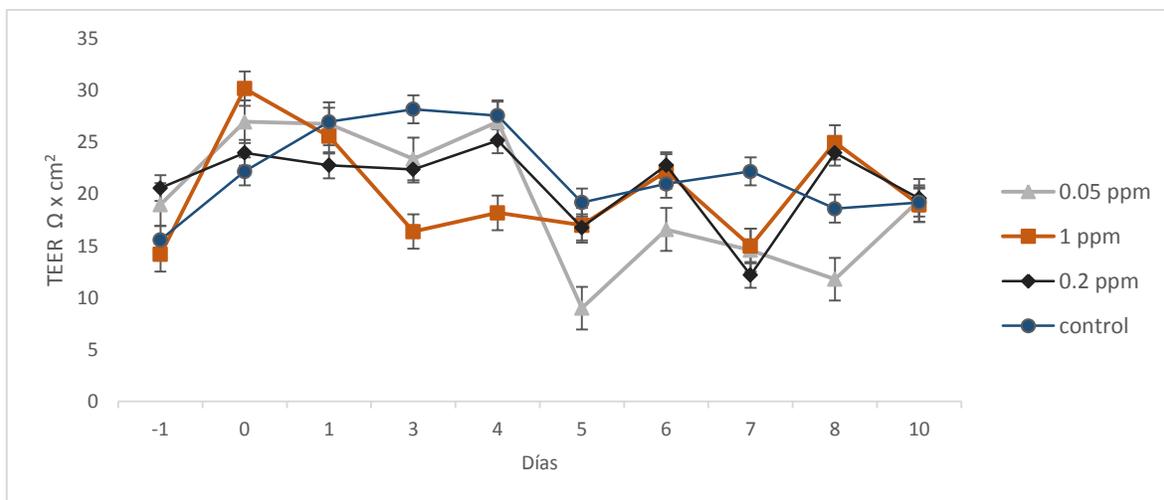


Figura 28. Efecto de AFG2 sobre la resistencia transepitelial eléctrica (TEER) en monocapa epitelial de RK13. Las células fueron crecidas en insertos transwell, el día 0 se hizo la aplicación de las diferentes concentraciones de AFG2. Células sin tratar (●), insertos tratados con 0.05 (Δ), 0.1 (◻) y 0.2 (◆) ppm de AFG2. Los valores del TEER son expresados como $\Omega \times \text{cm}^2$.

Es importante señalar que en ambas mediciones de TEER de células tratadas con FB1 y AFG2 no se logra alcanzar un periodo de “estabilidad” en ninguna de las concentraciones empleadas, como la mostrada en figura 25 o en el grupo control.

DISCUSIÓN

Morfología

Con respecto a las micotoxinas empleadas AFG2 y FB1, se observó la presencia de detritos celulares en ambos tratamientos, siendo más evidente en las concentraciones de 5 y 10 ppm de FB1. En el caso de FB1, los resultados coinciden con los estudios Del Rio et al (2007), quienes demostraron que la FB1 en concentraciones menores de 500 μM (361 ppm) no provoca cambios morfológicos sobre células intestinales de porcino (IPEC-1), solo se observó aumento en la cantidad de detritos celulares en el medio de cultivo a las 24 horas de contacto del cultivo con la micotoxina a la concentración más alta (500 μM). También hay coincidencia con el estudio *in vitro* de Yoo et al (1992) con células de riñón porcino (LLC-PK1) quien evaluó el efecto de FB1 sobre el cultivo, se observó que después de 24-48 horas de exposición a 35 μM de la micotoxina, la morfología de las células cambió a apariencia de fibroblastos, hubo

pérdida de contacto célula-célula, pero no se reportaron cambios morfológicos en concentraciones menores.

Sin embargo, en el estudio de Bouhet et al (2003) con células IPEC, donde se evaluó el efecto de FB1 a 50 μM (36.1 ppm) por 48 horas, se observaron pocas células separadas y pérdida de la morfología, es decir, se notó el efecto de FB1 sobre el cultivo a concentraciones mayores empleadas a las de este estudio, pero menores a la del estudio de Del Río (2007).

Tampoco se observaron cambios morfológicos en las células epiteliales RK13 tratadas con AFG2; sin embargo, Del Río et al (2007) han demostrado que la aflatoxina B1, la más tóxica de las aflatoxinas, provoca necrosis a concentraciones de 5, 50 y 100 μM , ensayos *in vitro* de acuerdo a Rodríguez (2010), la toxicidad de la aflatoxina G2 es aproximadamente 10% de la que presenta la AFB1. La AFB1, se activa a través de la conversión a un metabolito electrofílico AFB1-8,9-epóxido que requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9, que la AFG2 no posee, razón por la que las aflatoxinas B2 y G2 son prácticamente atóxicas comparadas con las B1 y G1 (Urrego, 2006).

Viabilidad

Las células RK13 mostraron sensibilidad similar para ambas micotoxinas, en el caso de FB1, la viabilidad se ve afectada por la micotoxina y no por la concentración, ya que estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de FB1.

La viabilidad celular disminuyó en un 6 y 5% con el tratamiento de 10 y 5 ppm de FB1, respectivamente, en comparación con el control. Los valores de viabilidad fueron de 96, 95 y 94% para las concentraciones de 3,5, y 10 ppm respectivamente.

Estudios de Yoo et al (1992) han señalado que concentraciones de 10-35 μM (7.2-25.2 ppm) de FB1 y FB2 inhiben la proliferación celular en células LLC-PK1 (células epiteliales de riñón de cerdo) con un tiempo de exposición de al menos 24 horas, periodo durante el cual el funcionamiento aparente de las células fue normal, sin

embargo, concentraciones mayores a 35 μM matan a las células. Un dato importante de este trabajo es que tan pronto se retiró la FB1 del cultivo, las células expuestas a la micotoxina exhibieron un crecimiento y morfología normal, siendo reversibles los efectos de FB1. Para el presente estudio, la viabilidad de las células tratadas con FB1 se vio afectada significativamente al ser comparada con el grupo control, sin embargo, no existió diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas, lo cual indica que no importa si la concentración a evaluar es menor o mayor, todas van a causar un mismo efecto sobre la proporción de células vivas y funcionales existentes en el cultivo de células RK13.

Otro estudio realizado por Bouhet et al 2003, con FB1 en células LLC-PK1 e IPEC-1 (epitelio de intestino porcino) señala que la FB1 inhibe la proliferación celular dependiente de la dosis, observándose una disminución significativa del crecimiento celular a concentraciones determinadas como no citotóxicas para ambas líneas (10 y 20 μM). Concluyeron IPEC-1 es sensible a 33 μM y LLC-PK1 es sensible a 36 μM , concentraciones que inhibieron el 50 % de la conversión a formazán, ambas concentraciones superiores a las empleadas en el presente trabajo.

Existen estudios que han demostrado el efecto anti proliferativo de FB1 en queratinocitos humanos, fibroblastos, células de hepatoma y células epiteliales de esófago (Tolleson et al, 1996). De igual forma en 2007 Del Rio et al concluyeron que concentraciones superiores a 50 μM de FB1 inhiben la proliferación en IPEC-1, mientras que a 3.7 μM se tuvo un menor daño sobre la viabilidad, coincidiendo con lo reportado en este estudio, pues la concentración de 3 ppm (4.15 μM) no tuvo diferencia significativa con el grupo control.

De igual forma es probable que el tiempo de exposición de las células RK13 a FB1 pudiera influenciar sobre el porcentaje de viabilidad, ya que el tiempo de exposición fue de 48 horas, pues Minervini en 2014 menciona que tiempos cortos de exposición (24-48 horas) de FB1 en células HT-29(línea intestinal de colón humano) no modificaron significativamente la proliferación celular, encontrando una inhibición del 30% de crecimiento celular a concentraciones mayores de 8.6 μM (12 ppm) por un periodo de exposición de 72 horas.

Para AFG2 los valores de viabilidad fueron de 98, 93 y 90% para 0.05, 0.1 y 0.2 ppm respectivamente, no habiendo diferencia entre el grupo control y 0.05 ppm, pero si entre el control y las concentraciones de 0.1 y 0.2 ppm, y al comparar entre concentraciones, no hubo diferencia entre 0.1 y 0.2 ppm, pero si entre 0.5 con 0.2 ppm. Del Rio et al 2007, evaluaron el efecto de AFB1 en concentraciones de 1.3 y 2 μ M sobre las células IPEC-1 que afectaron su capacidad proliferativa, siendo el daño más grave a concentraciones iguales o superiores a 5 μ M. Estos hallazgos concuerdan con los de otros investigadores, utilizando células HepG2 (células de hematoma humano) expuestas a periodos similares de 24 h. Sin embargo estos resultados se encontraron empleando concentraciones superiores a las trabajadas con AFG2, ya que la concentración mayor fue de 0.2 ppm (0.276 μ M), es decir 25 veces menor a la empleada en el artículo citado, razón por la cual pudieran no haberse encontrado un efecto sobre la capacidad proliferativa como la reportada en el artículo, de igual forma es importante considerar el grado de toxicidad que AFG2 tiene en comparación con la AFB1, ya que posee sólo el 10% de la toxicidad de AFB1, lo cual disminuye el efecto de AFG2 sobre la viabilidad del cultivo RK13.

Daño a citoesqueleto (filamentos de actina)

Se observó que FB1 tiene efecto sobre el citoesqueleto, específicamente sobre los filamentos de actina, ya que a las concentraciones de 5 y 10 ppm hubo una notoria disminución del grosor en la corteza celular, así como una fragmentación de la monocapa, pudiéndose presentar lisis e inhibición del crecimiento celular en esas áreas del cultivo.

Con respecto al efecto de la AFG2 sobre el citoesqueleto, en ninguna de las concentraciones empleadas (0.5, 0.1 y 0.2 ppm) se observó una alteración de la monocapa o grosor de la corteza celular, manteniéndose así la integridad de barrera de las células que forman la monocapa.

TEER

En el caso de la resistencia transepitelial, los valores máximos alcanzados para el grupo control fueron de $28 \Omega \times \text{cm}^2$ a las 72 horas, alcanzando una aparente estabilidad entre los días 6 y 7, ya que los valores de resistencia tuvieron mínima desviación entre sí en esos días, no siendo así para los grupos tratados con FB1 y AFG2, ya que, durante el periodo de medición de la resistencia, existieron variaciones importantes entre los valores obtenidos. Para esta línea celular, la medición se hizo por un periodo de 10 días, ya que en las células tratadas con FB1 la resistencia disminuyó hasta en un 98% con 10 ppm, es decir, un valor de $0.2 \Omega \times \text{cm}^2$ obtenido al final del experimento, mientras que para 5 y 3 ppm, la resistencia tuvo una reducción del 96 ($0.6 \Omega \times \text{cm}^2$) y 64 % ($6.8 \Omega \times \text{cm}^2$) respectivamente.

Se ha observado que algunas micotoxinas como DON a una concentración de $50 \mu\text{M}$ disminuyen la TEER hasta un 97% en células CaCo2 en evaluaciones realizadas por un periodo de 14 días (Pinton, 2009).

Existen estudios que demuestran que los valores de TEER así como el periodo de mantenimiento de las células dependen de la línea celular trabajada, en este estudio, las células RK13 (riñón de conejo), la resistencia en grupos sin tratar se pudo medir hasta 21 días, sin embargo para la línea celular CaCo2, se han reportado evaluaciones hasta por 18 días, alcanzando la estabilidad, es decir la integridad de barrera, al día 12 y con valores máximos de TEER de $390 \Omega \times \text{cm}^2$ en el día 14 (Ghaffarian y Muro, 2013). Mientras que con la línea celular IPEC-I después de 26-28 días un pequeño valor de TEER se encuentra aún presente (Bouhet et al 2003). En 2006 Schierak et al, evaluaron TEER en IPECJ-2 (epitelio intestinal de yeyuno porcino) por 14 días con valores de hasta $2000 \Omega \times \text{cm}^2$.

Específicamente efectos de FB1 sobre TEER en líneas celulares han demostrado para el caso de IPEC-I que la FB1 a concentraciones de 50, 200 y $500 \mu\text{M}$ disminuye la resistencia de manera dependiente de dosis y tiempo después de 8-12 días de tratamiento con la micotoxina, así mismo, la TEER disminuye independientemente del estado de diferenciación celular, observándose que durante los primeros 5 días los

valores de la resistencia no se vieron afectados independientemente de la concentración, y tras un periodo de 15 -18 días se pudo observar una alteración de la TEER a 200 y 500 μ M, mientras que para 50 μ M la disminución significativa de la TEER se observó a los 13 días (Bouhet et al 2003).

Al comparar los resultados de las células RK13 con los de Bouhet 2003, se puede observar que en los días 3 y 4 se dio una disminución importante de los valores de TEER independientemente de la concentración usada, considerando que las concentraciones usadas para RK13 son menores en comparación a las utilizadas en el estudio de Bouhet.

Es importante mencionar que en el 5to día de la medición de la TEER, independientemente de la concentración, pareciera que hay una recuperación o aumento de la resistencia, lo cual va ligado al hecho de que cada 48 horas se realizó el cambio de medio, tiempo en el cual las células absorben y metabolizan los nutrientes así como micotoxina contenida en el medio, existiendo un punto en el que la disponibilidad de micotoxina para la célula va disminuyendo debido al propio consumo por parte de ésta, provocando una parcial recuperación de la resistencia. Este hecho fue confirmado por Bouhet et al 2003 quienes mencionan un efecto de reversibilidad aparente, en un ensayo con células IPEC-I a las cuales se les aplicó FB1 durante 26 días y después éstas mismas células fueron cultivadas por un periodo de 16 días sin FB1, las cuales presentaron valores de TEER mayores a los obtenidos con la FB1, pero menores a los del grupo control, observándose la aparente reversibilidad.

Con respecto a las células tratadas con AFG2, éstas no presentaron una disminución tan distante con respecto a la TEER del grupo control, siendo la mayor disminución del 1.05% al final del experimento con la concentración de 0.1 ppm.

Por lo tanto, se puede decir que la FB1 altera la proliferación y por lo tanto la función de barrera de las células tratadas principalmente a concentraciones de 5 y 10 ppm, mientras que la AFG2 no presentó un efecto importante sobre la TEER y citoesqueleto por lo que la función de barrera de las células tratadas con esta micotoxina no se vio modificada.

La evaluación del daño a citoesqueleto, específicamente de los filamentos de actina que dan soporte y estructura a la célula, permitió observar un monocapa celular fragmentada, lo cual sugiere daños a la integridad de la membrana celular cuya función de barrera se vio disminuida debido a un aumento de la permeabilidad en la monocapa, indicado por la disminución del TEER en células RK13 y por tanto un flujo anormal de iones transcelulares, desequilibrio de rutas metabólicas y muerte celular (Suzuki,1995 y Pinton, 2009).

Asociado a la alteración del citoesqueleto y disminución de la TEER se encuentra la disminución de la viabilidad celular como indicador del efecto necrótico de la FB1 sobre las células RK13 (Rumora,2002), que puede observarse en la morfología con la aparición de detritos celulares, indicadores de muerte celular, es decir la micotoxina FB1 ocasionó la alteración de la estructura del citoesqueleto (filamentos de actina), lo que llevo a un aumento de la permeabilidad, disminución de la viabilidad, afectación de la integridad y morfología celular, que culminó en la muerte de las células de riñón de conejo RK13.

CONCLUSIONES

- ✚ La evaluación morfológica directa no permite observar una alteración morfológica clara, sin embargo, en los cultivos tratados con FB1 las pruebas complementarias realizadas son indicativas de alteración de la morfología, pues al observar los cultivos tratados mediante fluorescencia directa estos presentan una monocapa fracturada, así como disminución del grosor de los filamentos de actina que forman el citoesqueleto que a su vez dan forma y soporte a las células.
- ✚ FB1 tuvo un efecto importante sobre los filamentos de actina de la monocapa de células RK13 y por tanto sobre el citoesqueleto, inhibiendo la proliferación celular y la recuperación de la monocapa, teniendo como consecuencia la fragmentación de ésta. AFG2 no tuvo efecto sobre los filamentos de actina de la monocapa de células RK13, por lo que la FB1 daña la integridad de barrera celular, teniendo como consecuencia el aumento en la permeabilidad de ésta.
- ✚ La viabilidad de células RK13 se ve disminuida por ambas micotoxinas, principalmente por FB1, cuyo efecto es mayor al de AFG2.
- ✚ FB1 si altera la resistencia transepitelial eléctrica (TEER) de forma importante en comparación con AFG2, sin embargo, el comportamiento es diferente, ya que la FB1 comienza a alterar de manera temprana y mucho más agresiva la TEER, llegando incluso a valores que indican una resistencia nula provocada por la fragmentación de la monocapa, no siendo así para la AFG2 cuyo efecto fue menor sobre la resistencia.

RECOMENDACIONES

- ✚ Realizar a la par una comparación con cultivos celulares en los que ya haya estudios de los efectos de estas micotoxinas, pero con las concentraciones empleada en este trabajo, ya que la mayoría de estudios existentes emplean concentraciones superiores a las encontradas en campo ($> 50\mu\text{M}$).
- ✚ Evaluar si existe sinergismo entre FB1 y AFG2 sobre células RK13 en un estudio donde se combinen concentraciones de ambas micotoxinas.
- ✚ Realizar un estudio *in vitro* en enterocitos de pollo y posteriormente un estudio *in vivo* con las concentraciones empleadas en este trabajo de FB1, AFG2.

REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter P. (2015). *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 6th Ed. New York, USA.
2. Ayala, A. E. G. (2007). Alimentos y micotoxinas: implicaciones en la seguridad alimentaria. *Farmacia profesional*, 21(8), 49-53.
3. Biomin. (2015). Encuesta mundial de micotoxinas. Science and solutions. Recuperado de: <https://www2.biomin.net/es/revistas/science-solutions-numero-especial-micotoxinas/>
4. Bouhet, S., Hourcade, E., Loiseau, N., Fikry, A., Martinez, S., Roselli, M., & Oswald, I. P. (2003). The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 77(1), 165-171.
5. Bouhet, S., Le Dorze, E., Peres, S., Fairbrother, J. M., & Oswald, I. P. (2006). Mycotoxin fumonisin B1 selectively down-regulates the basal IL-8 expression in pig intestine: in vivo and in vitro studies. *Food and chemical toxicology*, 44(10), 1768-1773.
6. Bueno, D. J., Salvano, M., Silva, J. O., González, S. N., & Oliver, G. (2001). Micotoxinas: diagnóstico y prevención en aves de corral. *Boletín Micológico*, 16.
7. Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Re*, 2003, 16.
8. Beltrán Vargas, N. E. (2016). Técnicas de cultivos celulares e ingeniería de tejidos.
9. Brugère-Picoux, J., Vaillancourt, J. P., Bouzouaia, M., Shivaprasad, H. L., & Venne, D. (Eds.). (2015). *Manual of Poultry Diseases*. AFAS.
10. Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16(2), 109-120.
11. Cooper, GM and Hausman RE. (2009). *The Cell, A Molecular Approach*. ASM Press, 5th ed. Massachusetts, USA.
12. Cramer, LP. (1997). Molecular mechanism of actin-dependent retrograde flow in lamellipodia of motile cells. *Frontiers in Bioscience*, 2:d260-270..
13. de la Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin-Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91.
14. del Río García, J. C., Ramos, C. M., Pinton, P., Elvira, S. M., & Oswald, I. P. (2007). Evaluación de la citotoxicidad de la aflatoxina y la fumonisin en células intestinales de porcino. *Revista iberoamericana de micología*, 24(2), 136-141

15. Deepa, N., & Sreenivasa, M. Y. (2017). Fumonisin: A review on its global occurrence, epidemiology, toxicity and detection. *J Vet Med Res*, 4(6), 1093-1102.
16. EMD Millipore Corporation. (2016). *Millicel ERS-2 Electrical Resistance System*. Billerica:Merck.
17. FAO (Organizacion de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentacion, Italia). Analítico: Manual sobre la aplicacion del sistema de analisis de peligros y de puntos criticos de control (APPCC) en la prevencion y control de las micotoxinas. *Estudio FAO Alimentacion y Nutricion*.
18. Futerman, A. H., & Hannun, Y. A. (2004). The complex life of simple sphingolipids. *EMBO reports*, 5(8), 777-782.
19. Ghaffarian, R., & Muro, S. (2013). Models and methods to evaluate transport of drug delivery systems across cellular barriers. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (80), e50638.
20. Galarza-Seeber, R., Latorre, J. D., Bielke, L. R., Kuttappan, V. A., Wolfenden, A. D., Hernandez-Velasco, X., & Hargis, B. M. (2016). Leaky gut and mycotoxins: Aflatoxin B1 does not increase gut permeability in broiler chickens. *Frontiers in veterinary science*, 3, 10.
21. García, J., Fernández-Blanco, C., Font, G., & Ruiz, M. J. (2014). Efectos tóxicos de alternariol por ensayos in vitro: revisión. *Revista de Toxicología*, 31(2), 196-203
22. Gimeno, A., & Martins, M. L. (2011). Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. *Special Nutrients, Florida*, 50-53.
23. Gimeno, I. M. (2013). *Enfermedades inmunosupresoras en avicultura* (No. V605 GIMe).
24. Gutiérrez, R. R., Soria, M. Z., Duran, A. B., Murrieta, M. N., Ramón, G. V., Ibarra, G. T., & García, R. B. (2017). Determinación de fumonisinas en maíz de consumo humano y forrajero expedido en la ciudad de Tepic. *Revista Bio Ciencias*, 4(5), 13.
25. Hanelt, M., Gareis, M., & Kollarczik, B. (1994). Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia*, 128(3), 167-174.
26. Heckman CA and Plummer III. (2013). Filopodia as sensors. *Cell. Signalling* 25:2298-2311.
27. Jardon, S., García, C. G., Quintanar, D., Nieto, J. L., de Lourdes Juárez, M., & Mendoza, S. E. (2018). Effect of two glycyrrhizic acid nanoparticle carriers on MARC-145 cells actin filaments. *Applied Nanoscience*, 8(5), 1111-1121.
28. Minervini, F., Garbetta, A., D'Antuono, I., Cardinali, A., Martino, N. A., Debellis, L., & Visconti, A. (2014). Toxic mechanisms induced by fumonisin B 1 mycotoxin on human intestinal cell line. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 67(1), 115-123.

29. Morales Mena, Arantxa, sustentante (2017). Evaluación del efecto de la inclusión de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (PCL) y bentonita en la dieta de pollos de engorda que consumen alimento inoculado con aflatoxina B1 y fumonisina B1 / Cuautitlán Izcalli, México.
30. Moreno, J. A. C. (2016). Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana. *Vol. 17, No. 9*.
31. Orsi RB, Dilkin P, Xavier JG, Aquino S, Rocha LO, Correa B. (2009). Acute toxicity of a single gavage dose fumonisin B₁ in rabbits. *Chem-Biol Inter* 179: 351-355.
32. Passey, S., Pellegrin, S and Mellor H. (2004). What is in a filopodium? Starfish versus hedgehogs. *Biochemical Society Transactions* 32, part 6: 1115-1117.
33. Perusia, O. R., & Rodríguez, R. (2001). Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12(2), 87-116.
34. Pinton, P., Nougayrède, J. P., Del Rio, J. C., Moreno, C., Marin, D. E., Ferrier, L., & Oswald, I. P. (2009). The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicology and applied pharmacology*, 237(1), 41-48.
35. Pollard TD and Earnshaw WC. (2008). *Cell Biology*. Saunders Elsevier, 2nd ed. Philadelphia, USA.
36. Roblero Martínez, Martha Liliana, sustentante (2016). Efecto de la serotonina sobre los filamentos de actina en células RK13 / Cuautitlán Izcalli, México.
37. Rodríguez Eloisa, Héctor Isaac sustentante (2009). Alteraciones morfológicas y bioquímicas en el pollo de engorda por ingestión de fumonisinas / Cuautitlán Izcalli, México.
38. Rodríguez, H. W. M. (2010). Micotoxinas y Aflatoxina B1, un problema en salud animal. *Teoría y praxis investigativa*, 5(2), 71-78.
39. Roy S and Kornberg TB. (2015). Paracrine signaling mediated at cell-cell contacts. *Bioessays* 37(1):25–33.
40. Rumora, L., Kovačić, S., Rozgaj, R., Čepelak, I., Pepeljnjak, S., & Grubišić, T. Ž. (2002). Cytotoxic and genotoxic effects of fumonisin B 1 on rabbit kidney RK13 cell line. *Archives of toxicology*, 76(1), 55-61.
41. Sánchez, R. C., Martorell, J. C., & Baldoví, E. C. (2012). Micotoxicosis derivadas de la nutrición animal. Revisión del tema. *Nereis. Interdisciplinary Ibero-American Journal of Methods, Modelling and Simulation*, (4), 51-61.
42. Scott, P. M. (2012). Recent research on fumonisins: a review. *Food additives & contaminants: part A*, 29(2), 242-248.
43. Serrano-Coll, H. A., & Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Medicina*, 29(1), 143-151.
44. Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K. D., Amasheh, S., Lodemann, U., & Tedin, K. (2006). Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochemistry and cell biology*, 125(3), 293-305.

45. Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ediciones Díaz de Santos.
46. Suzuki, CAM., Hierlihy L, Barker M, Curran I, Mueller R, Bondy GS (1995) The effects of fumonisin B1 on several markers of nephrotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 133:207–214
47. Takahashi, S., Iwamoto, N., Sasaki, H., Ohashi, M., Oda, Y., Tsukita, S., & Furuse, M. (2009). The E3 ubiquitin ligase LNX1p80 promotes the removal of claudins from tight junctions in MDCK cells. *Journal of cell science*, 122(7), 985-994.
48. Tolleson, W. H., Melchior Jr, W. B., Morris, S. M., McGarrity, L. J., Domon, O. E., Muskhelishvili, L., ... & Howard, P. C. (1996). Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis*, 17(2), 239-249.
49. Uribe Rivera, Jacqueline, sustentante (2015). Efecto de la fumonisin b1 sobre la respuesta inmune celular y variables productivas en el pollo de engorda / Cuautitlán Izcalli, México.
50. Urrego Novoa, J. R., & Días, G. J. (2006). Aflatoxinas: mecanismos de toxicidad en la etiología de cáncer hepático celular. *Revista de la Facultad de Medicina*.
51. Van Egmond, H. P., & Jonker, M. A. (2004). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y las raciones en el año 2003. *Food & Agriculture Org*.
52. Voss, K.A, G.W. Smith b, W.M. Haschek., (2007). Review, Fumonisin: Toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology* 137 (2007) 299–325.
53. Voss, K. A., & Riley, R. T. (2013). Fumonisin toxicity and mechanism of action: overview and current perspectives. *Food Safety*, 1(1), 2013006-2013006.
54. Wang, E., Riley, R. T., Meredith, F. I., & Merrill Jr, A. H. (1999). Fumonisin B1 consumption by rats causes reversible, dose-dependent increases in urinary sphinganine and sphingosine. *The Journal of nutrition*, 129(1), 214-220.
55. Yoo, H. S., Norred, W. P., Wang, E., Merrill Jr, A. H., & Riley, R. T. (1992). Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. *Toxicology and applied pharmacology*, 114(1), 9-15.
56. Yunus, A. W., Razzazi-Fazeli, E., & Bohm, J. (2011). Aflatoxin B1 in affecting broiler's performance, immunity, and gastrointestinal tract: A review of history and contemporary issues. *Toxins*, 3(6), 566-590.