

**EFECTO CITOTÓXICO DEL DEOXINIVALENOL SOBRE CÉLULAS  
HUMANAS Y SU PRESENCIA EN EL ARROZ CULTIVADO EN CÚCUTA Y EL  
ZULIA**

**HAROLD DUVAN GARZÓN GONZÁLEZ**

**Universidad de Pamplona  
Facultad de Ciencias Básicas  
Departamento de Biología  
Pamplona, 2019**

**EFECTO CITOTÓXICO DEL DEOXINIVALENOL SOBRE CÉLULAS  
HUMANAS Y SU PRESENCIA EN EL ARROZ CULTIVADO EN CÚCUTA Y EL  
ZULIA**

**HAROLD DUVAN GARZÓN GONZÁLEZ**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar por el título de:  
**Biólogo**

Director:

Ph.D Nancy Jaimes Méndez

Co-director:

MSc. Liliana Rojas Contreras

**Universidad de Pamplona**

**Facultad de Ciencias Básicas**

**Departamento de Biología**

**Pamplona, 2019**

**DEDICATORIA**

*A Dios, porque por su voluntad pude emprender esta hermosa carrera y por su amor la he culminado. Éste trabajo de grado es una pequeña muestra de lo que se puede alcanzar por y para la gloria de Dios.*

*A mis padres, Luz y Cesar, por ser el pilar de mi vida, por su amor, por su esfuerzo, por su apoyo incondicional, por darme la oportunidad de estudiar ésta carrera y por todo lo que día a día hacen por mi.*

*A mis abuelos, por su cariño, por ser el mejor ejemplo para encontrar la felicidad en las pequeñas cosas y en la vida.*

*A mi pareja, Marialejandra, por ser parte de mi felicidad, por su apoyo y compañía en todos mis proyectos, por inspirarme a ser mejor persona.*

## AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Nancy Jaimes Méndez, por ser parte de mi formación integral y profesional, por ser mi guía en todo el proceso, por enseñarme las cosas técnicas y humanas requeridas para la culminación de este trabajo, y en especial, de esta etapa académica.

A mi cotutora, Liliana Rojas Contreras, por compartir conmigo su conocimiento y apoyarme para la culminación de este trabajo.

A mis familiares y amigos, por ser mi compañía en todo momento y darme palabras de aliento cuando más lo necesité.

A la Viverrectoria de Investigaciones de la Universidad de Pamplona, por la financiación del proyecto.

Al Centro de Microscopía y Microanálisis, encabezado por Gerardo Andrés Torres y Magnolia Herrea.

Al Centro de Microscopía Electrónica “Ernesto Palacios Prü”.

Al Instituto de Inmunología Clínica (Mérida, Venezuela).

Al Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO).

Al semillero de investigación en Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN).

Al Laboratorio de Genética de la Universidad de Pamplona.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>3</b>
2.1. Cereales .....	3
2.1.1. Arroz .....	3
2.2. Hongos.....	5
2.2.1. Hongos Toxigénicos.....	6
2.3. Micotoxinas .....	8
2.3.1. Deoxinivalenol (DON) .....	16
2.3.1.1. Citotoxicidad de DON y Apoptosis .....	19
2.4. Línea Celular HepG2.....	26
2.5. Ensayo MTT .....	27
2.6. Antecedentes.....	29
2.6.1. Cuantificación de DON en Colombia.....	29
2.6.2. Citotoxicidad del DON .....	31
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>34</b>
3.1. Objetivo General.....	34
3.2. Objetivos Específicos .....	34
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>35</b>

4.1.	Área de Estudio .....	35
4.2.	Muestras .....	36
4.3.	Aislamiento e Identificación de Hongos .....	36
4.3.1.	<i>Aislamiento de hongos de las muestras de arroz</i> .....	36
4.3.1.1.	<i>Reconocimiento de Hongos Control</i> .....	38
4.3.1.2.	<i>Reconocimiento de Hongos de Superficie del Grano</i> .....	38
4.3.1.3.	<i>Reconocimiento de Hongos a profundidad del Grano</i> .....	38
4.3.2.	<i>Identificación de Hongos</i> .....	38
4.4.	Detección y Cuantificación del Deoxinivalenol.....	39
4.5.	Liofilización de DON .....	40
4.6.	Cultivo Celular .....	40
4.7.	Ensayo de Citotoxicidad.....	40
4.7.1.	<i>Cálculo de la concentración inhibitoria <math>CI_{50}</math></i> .....	41
4.8.	Microscopía Electrónica de Transmisión .....	41
4.9.	Extracción de Células Polimorfonucleares.....	42
4.10.	Apoptosis por Citometría de Flujo .....	42
4.11.	Análisis Estadístico .....	43
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
5.1.	Presencia de Hongos Micotoxigénicos en Arroz.....	44
5.2.	Detección de DON en el Arroz Cultivado.....	46

5.3.	Toxicidad del DON Sobre la Línea Celular HepG2.....	48
5.4.	Cambios Morfológicos y Apoptosis de las Células HepG2 por DON .....	51
5.5.	Apoptosis inducida por DON en Células Polimorfonucleares.....	53
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>64</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Ensayos para la detección de la etapa temprana y tardía de la apoptosis. ....	25
<b>Tabla 2.</b> Antecedentes nacionales de micotoxinas en cereales. ....	30
<b>Tabla 3.</b> Estudios citotoxicos de DON.....	32
<b>Tabla 4.</b> Georreferenciación de los puntos de muestreo del arroz cultivado. ....	36
<b>Tabla 5.</b> Hongos toxigénicos asociados al arroz.....	45
<b>Tabla 6.</b> Detección del DON en las muestras de arroz en cultivo por HPLC.....	47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura química de varias micotoxinas.....	8
<b>Figura 2.</b> Exposición humana a micotoxinas.....	11
<b>Figura 3.</b> Estructura básica de los tricotecenos.....	12
<b>Figura 4.</b> Estructura química de tricotecenos tipo A. ....	13
<b>Figura 5.</b> Estructura química de tricotecenos tipo B.....	13
<b>Figura 6.</b> Ruta bioquímica de la síntesis de DON, NIV y T-2.....	15
<b>Figura 7.</b> Estructura del DON.....	16
<b>Figura 8.</b> Mecanismo molecular de la toxicidad de DON. ....	21
<b>Figura 9.</b> Reducción de la sal de tetrazolio MTT a Forman. ....	28
<b>Figura 10.</b> Registro de micotoxinas en cereales por departamento y estudios del DON.	31
<b>Figura 11.</b> Área de estudio y puntos de muestreo.....	35
<b>Figura 12.</b> Metodología para el aislamiento de hongos de las muestras de arroz cultivado.....	37
<b>Figura 13.</b> Cromatograma de un estándar de Deoxinivalenol. ....	39
<b>Figura 14.</b> Características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados en las muestras de arroz. ....	44
<b>Figura 15.</b> Incidencia de hongos en muestras de arroz cultivado por metodología y municipio. ....	46
<b>Figura 16.</b> Citotoxicidad del DON sobre las células HepG2.....	48
<b>Figura 17.</b> Citotoxicidad del DON dependiente al tiempo y concentración.....	49
<b>Figura 18.</b> CI <sub>50</sub> del DON en las células HepG2 a 48h (A) y 72h (B). ....	50
<b>Figura 19.</b> Microscopía electrónica de Transmisión de las células HepG2, expuestas a 50 $\mu$ M DON.....	52

<b>Figura 20.</b> Potencial apoptótico de DON sobre células polimorfonucleares humanas por medio de los marcadores AnexinaV/FiTC y IP. ....	53
<b>Figura 21.</b> Agrupación de las muestras según el número de células polimorfonucleares en estado apoptótico inducido por DON.....	54

## RESUMEN

En la actualidad, la frecuente contaminación con deoxinivalenol (DON) en los granos de cereales y sus subproductos, se ha convertido en un problema importante en la industria alimentaria y en la salud pública a nivel mundial. Por ende, en el presente estudio, se estableció la presencia de hongos micotoxigénicos y de DON en el arroz cultivado en los municipios de Cúcuta y El Zulia. La incidencia de los hongos micotoxigénicos en el arroz cultivado se evaluó por medio de siembras en agar PDA y la presencia de DON con la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Sumado a esto, se evaluó el efecto citotóxico de DON en la línea celular HepG2 y en células polimorfonucleares (PMN), mediante los parámetros de viabilidad celular (MTT), cambios morfológicos (Microscopía Electrónica de Transmisión) y tipo de muerte celular (Citometría de Flujo). Se evidenció la presencia de hongos micotoxigénicos del género *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp., siendo éste último el de mayor ocurrencia en las muestras de arroz cultivado en los municipios mencionados. Por el contrario, no se presentaron valores detectables de DON en las muestras de arroz. El efecto citotóxico de DON en las células HepG2, se presentó de manera dependiente de la concentración y tiempo de exposición, con una  $CI_{50}$  de  $42,82 \mu M \pm 1,2$  y  $29,6 \mu M \pm 4,8$  a 48 y 72 h., respectivamente. Se observaron cambios morfológicos en las células HepG2, como fragmentación del contenido celular y nuclear, formación de protuberancias en la membrana plasmática, cuerpos apoptóticos, así como alteraciones de la morfología celular y por tanto pérdida de los contactos célula a célula. Finalmente, se detectaron cambios bioquímicos como la externalización de las fosfatidilserina y la fragmentación del DNA por citometría de flujo en las células PMN, que determinaron la apoptosis en hasta el  $52,74 \% \pm 1,3$  de la población celular. Los resultados sugieren que el arroz en cultivo presenta las condiciones óptimas para el crecimiento de hongos toxigénicos

como *Fusarium* spp., pero no para la producción del DON. Por otro lado, indican que la exposición al DON sobre las células HepG2 y PMN resulta en la muerte celular apoptótica.

**Palabras clave:** Apoptosis, arroz cultivado, citotoxicidad, deoxinivalenol, *Fusarium* spp.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos secundarios de hongos filamentosos que colonizan una amplia gama de cereales antes y después de la cosecha, entre los que se encuentran el trigo, el maíz y el arroz (Choi et al., 2018; Manizan et al., 2018). Actualmente, se han descrito cerca de 500 micotoxinas (Broom, 2015), pero se presta atención principalmente a las aflatoxinas (AFs), deoxinivalenol (DON), nivalenol (NIV), zearalenona (ZEA), ocratoxina A (OTA), la toxina T-2 (T-2) y fumonisinas (FUM), que representan un riesgo para la salud pública y la agro-economía (Tala y kebede, 2016; Zain, 2011). La exposición a las micotoxinas puede contribuir a una variedad de problemas para la salud humana, ya que pueden generar efectos hepatotóxicos, nefrotóxicos, carcinogénicos, citotóxicos, inmunosupresores, inflamatorios, neurológicos, estrogénicos y/o teratogénicos (Slobodchikova y Vuckovic, 2018).

Los géneros más comunes de hongos micotoxigénicos en alimentos y piensos son *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Penicillium* spp. (Luo, Liu, y Li, 2018). Las micotoxinas producidas por *Fusarium* spp., DON, T-2, ZEA y fumonisina B1 (FB1), constituyen una de las principales causas de toxicidad en humanos y animales (Taroncher et al., 2018). DON es la micotoxina tricotecena más prevalente asociado a los alimentos, y se ha reportado ampliamente en cereales como el trigo, maíz y arroz (Peng, Marchal, y Van der Poel, 2018).

DON, se transfiere de los alimentos a órganos como el intestino, hígado y riñones; en donde, gracias a su naturaleza anfipática, puede atravesar fácilmente las membranas celulares e interactuar con diferentes orgánulos como los ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico, desencadenando alteraciones celulares (Wu et al., 2014b). Dado que estructuralmente DON cuenta con 3 radicales (OH-) libres, puede generar ROS intercelular, e inducir estrés oxidativo (Mishra et al., 2014; Kang et al., 2019; Yang et al., 2019), provocando así, la inhibición de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN, alteración de la

función mitocondrial; la división, señalización y diferenciación celular; la integridad de la membrana y conducir a la muerte celular por apoptosis (Li et al., 2014a; Li et al., 2014b; Nogueira et al. 2011; Pestka y Smolinski, 2005; Pestka, 2010; Ran et al., 2013; Rocha et al., 2005).

Según un estudio de la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO), entre un 25-50% de la producción mundial de alimentos y piensos, especialmente los alimentos básicos, está contaminada por al menos una micotoxina, de las cuales, las micotoxinas metabolizadas por *Fusarium* spp. son las toxinas fúngicas más importantes económicamente (Huang et al., 2019a; Rocha et al., 2014; Slobodchikova y Vuckovic, 2018). El arroz, gracias a su alto contenido nutricional, es uno de los alimentos básicos de la canasta familiar; siendo el alimento más consumido por la población colombiana (73,8%) (INS, 2015). Y a su vez, es uno de los cereales que presenta contaminación por hongos toxigénicos especialmente del género *Fusarium* spp. (Ok, lee y Chun, 2018; Pacin et al., 2002).

Por tanto, dado que Norte de Santander, es uno de los departamentos de mayor participación en la producción nacional de arroz con 184,262 t en un área cosechada de 34.187 ha (DANE – FEDEARROZ, 2017), es de vital importancia tener registros regionales de los hongos productores de micotoxinas que se encuentran en el arroz en cultivo, para detectar la posible contaminación; así como, evaluar el efecto citotóxico de DON que puede estar relacionado con procesos celulares como la apoptosis en la línea celular HepG2 y en células polimorfonucleares humanas.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Cereales

Los cereales y sus derivados son los productos agrícolas más importantes en las dietas de humanos y otros animales a nivel mundial (Okeke et al., 2018), pues proporcionan cantidades significativas de la mayoría de los nutrientes como carbohidratos y proteínas, ácidos grasos esenciales, todas las vitaminas del complejo B, vitamina E, hierro y otros oligoelementos importantes, fitoquímicos y fibra (Das, Raychaudhuri y Chakraborty, 2011; Pereira, Fernández y Cunha, 2014). Además, proporcionan el 90% de la ingesta energética mundial, siendo el arroz, maíz y trigo, las que representan dos tercios de este 90% (Sarocco y Vannacci, 2018).

Los cultivos de cereales son vulnerables a la infección por diversos patógenos de las plantas, incluidos los hongos, que son la causa más frecuente de enfermedad y deterioro de los cereales (Choi et al., 2018); generando, grandes pérdidas económicas y una intoxicación aguda o crónica en humanos y animales (Jedidi et al., 2018). Los hongos afectan principalmente el grano de los cereales de maíz, trigo y arroz durante su cosecha, transporte o almacenamiento; por lo que es considerado como el principal vector de compuestos micotoxigénicos en alimentos y piensos (Neme y Mohammed, 2017; Nguyen et al., 2017; Tala y Kbede, 2016).

#### 2.1.1. Arroz

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una planta monocotiledónea que pertenece a la familia Poaceae (Champagne et al., 2004; Amagliani et al., 2017). Es un pasto semiacuático y débilmente perenne (Zigler, 2017). El arroz es uno de los tres cultivos alimentarios más

importantes junto al trigo y el maíz (FAO, 2016). Es el alimento básico de más de la mitad de la población (Shraim, 2017), y es el cereal alimenticio más importante para las personas que viven en países en desarrollo (Zeigler, 2017); siendo, posiblemente, el alimento humano más importante del mundo. Casi 165 millones de hectáreas (FAO, 2017) se utilizan para la producción de arroz con una producción mundial anual estimada en alrededor de 480 millones de toneladas métricas (expresadas en arroz molido) (USDA, 2015). Actualmente, se cultiva en más de 100 países (Muthayya et al., 2014), con China e India en solitario representando más del 50% de la producción mundial de arroz (USDA, 2015).

Debido a su alto contenido nutricional, el arroz es uno de los cultivos alimentarios más importantes a nivel mundial, pues representa una buena fuente de carbohidratos, proteínas, fibra dietética, vitamina B6, magnesio, zinc, cobre, entre otros (Bhullar y Gruissem, 2013; Santos da Silva, Paim, y Silva, 2018; Sharif et al., 2014; Shraim, 2017; Singh, Kaur y Ogawa, 2016;).

Gracias a su composición, y en condiciones ambientales favorables, el arroz es un sustrato excelente para el crecimiento de hongos y la producción de micotoxinas (Trung, 2008; Reddy, 2009; Reddy et al., 2009; Huong et al., 2016) durante las prácticas agrícolas de producción y poscosecha (Ok et al., 2014; Ferre, 2016; Ok et al., 2018).

Varios estudios han demostrado que los hongos principales que se encuentran en el arroz pertenecen al género *Fusarium* spp., que pueden producir micotoxinas tricotecenas (Pacin et al., 2002; Ok et al., 2018). También se ha demostrado que el deoxinivalenol (DON) y el nivalenol (NIV), que pertenecen a los tricotecenos tipo B, se detectan frecuentemente en la misma muestra, en donde el DON generalmente presenta una ocurrencia natural mayor (Edwards et al., 2011).

En Colombia, el arroz representa el 13% del área sembrada (599.799 ha), el 19% del área cosechada (589.728 ha) y el 14,7% de la producción agrícola con 3.432.294 t (DANE, 2017). El consumo per cápita en Colombia para el 2017 de la población en general se estimó en 41.34 Kg (Fedearroz, 2017), siendo el alimento más consumido por la población colombiana (73,8%) (INS, 2015). Así mismo, el arroz ocupa el primer lugar en términos de valor económico entre los cultivos de ciclo corto (FAO, 2004). Además, Colombia es uno de los principales países productores de arroz de América Latina y del Caribe (FAO, 2017b), y es también el país anfitrión del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y del Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR) (FAO, 2004).

Norte de Santander, es uno de los departamentos de mayor participación en la producción nacional de arroz con 184,262 t en un área cosechada de 34.187 ha (DANE – FEDEARROZ, 2017), provenientes de nueve de los cuarenta municipios que lo componen: Cúcuta, El Zulia, Tibú, San Cayetano, La Esperanza, Puerto Santander, Villa del Rosario, Los Patios y Santiago, los cuales son cultivadas por el sistema de riego, cuya fuente de suministro es el río Zulia (Cuevas, 2012).

Los municipios Cúcuta y El Zulia son los mayores representantes del departamento con una producción de 111.262 t en 24.053 ha de área sembrada y 26.005 t en 5.206 ha de área sembrada, respectivamente (DANE – FEDEARROZ, 2017).

## **2.2.HONGOS**

Los hongos son un gran grupo de diversos organismos eucariotas (1.5 millones de especies con 70,000 especies descritas hasta la fecha) que incluyen levaduras y hongos filamentosos (Ashiq, Hussain y Ahmad, 2014; Sherrington et al., 2018). Los hongos filamentosos son organismos microscópicos multicelulares, compuestos de largos filamentos llamados hifas,

que crecen sobre la superficie y el interior de casi todas las sustancias de origen vegetal o animal (Moore, Robson y Trinci, 2011; Adeyeye, 2016). Se distribuyen ampliamente en la naturaleza y se encuentran donde quiera que haya humedad, con esporas capaces de viajar grandes distancias a través de la superficie del planeta (Hirst y Stedman 1967; Adejumo & Adejoro, 2014; Ashiq et al., 2014; Ahmad et al., 2014; De Ruyck et al., 2015). Los hongos presentan características fisiológicas versátiles que les permite ser contaminantes ambientales comunes y, bajo condiciones favorables de humedad y temperatura, pueden propagarse y colonizar una variedad de sustratos (Huis in't Veld, 1996; García et al., 2009; Ahmad et al., 2014; Ashiq et al., 2014).

Los hongos filamentosos son capaces de producir un amplio espectro de pequeñas moléculas auxiliares bioactivas que se denominan metabolitos secundarios, porque no son esenciales para su crecimiento y desarrollo normal; y cada especie de hongo tiene un perfil de metabolitos secundarios propios (Menke et al., 2013; Moretti et al., 2013; Patriarca y Fernández, 2017). Los metabolitos secundarios son estructuralmente diversos, la mayoría de los metabolitos secundarios fúngicos son productos de vías bioquímicas de varios pasos que a menudo comienzan cuando una terpenosintasa, policétidosintasa o péptido sintetasa no ribosomal cataliza la reordenación o condensación de un metabolito primario relativamente simple para formar una molécula más compleja, es decir, un terpeno, policétido o péptido no ribosómico (Keller, Turner y Bennett, 2005; Hoffmeister y Keller, 2007; Menke et al., 2013; Moretti et al., 2013).

### **2.2.1. Hongos Toxigénicos**

Los hongos toxigénicos son un problema importante en los cultivos de cereales, ya que pueden colonizar una amplia variedad de cultivos y acumular una gran cantidad de

metabolitos tóxicos en los productos infectados en las etapas de precosecha, postcosecha y almacenamiento, pues tienen la capacidad de crecer en una amplia gama de condiciones ambientales (Oliveira et al., 2014a, Patriarca y Fernández, 2017).

Más de 300 especies de hongos sintetizan moléculas tóxicas para humanos y animales: las micotoxinas (Neme y Mohammed, 2017). La producción de micotoxinas a menudo no está relacionada con la biomasa fúngica total, y los requisitos ecológicos para el crecimiento y la producción de éstas pueden diferir considerablemente entre las especies de hongos (Magan, 2006; Bryden, 2012). Los hongos que sintetizan las principales micotoxinas, y, por tanto, tienen mayor preocupación a nivel mundial, pertenecen a los géneros *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., y *Fusarium* spp. (AFSSA, 2006; Zain, 2011; Manizan et al., 2018). Otros géneros como *Chaetomium* spp., *Diplodia* spp., *Myrothecium* spp., *Phoma* spp., *Phomopsis* spp., *Pithomyces* spp. y *Strachybotrys* spp. también contienen especies toxigénicas (Moss, 1991; Bryden, 2012). Estos hongos producen muchos compuestos tóxicos diferentes, pero no todos los aislados de la misma especie producen toxinas (Cole et al., 2003; Brase et al., 2009). Algunos de ellos causan deterioro en los alimentos típicamente durante el almacenamiento (*Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.), mientras que otros (*Alternaria* spp., y *Fusarium* spp.) son patógenos de la planta, generalmente con especificidad del hospedador, causando contaminación y la consiguiente acumulación de toxina en la etapa previa a la cosecha (Patriarca y Fernández, 2017). Los hongos patógenos que invaden los cultivos antes de la cosecha generalmente requieren niveles de humedad más altos para la infección que los hongos que pueden proliferar durante el almacenamiento (Bryden, 2012).

### 2.3. Micotoxinas

Las micotoxinas son moléculas orgánicas de bajo peso molecular producidas como metabolitos secundarios de hongos filamentosos que colonizan una amplia gama de cultivos, incluidos los cereales y las semillas oleaginosas, tanto en el campo, después de la cosecha y durante el almacenamiento (Eckhardt et al., 2014; Iqbal et al., 2014; Manizan et al., 2018). Las micotoxinas son moléculas policetónicas que se sintetizan principalmente cuando el hongo alcanza la madurez. Presentan estructuras que varían desde simples anillos heterocíclicos con pesos moleculares de hasta 50 Da, hasta grupos con 6-8 anillos heterocíclicos dispuestos irregularmente con un peso molecular total >500 Da (Fig. 1) (Rocha et al., 2014).

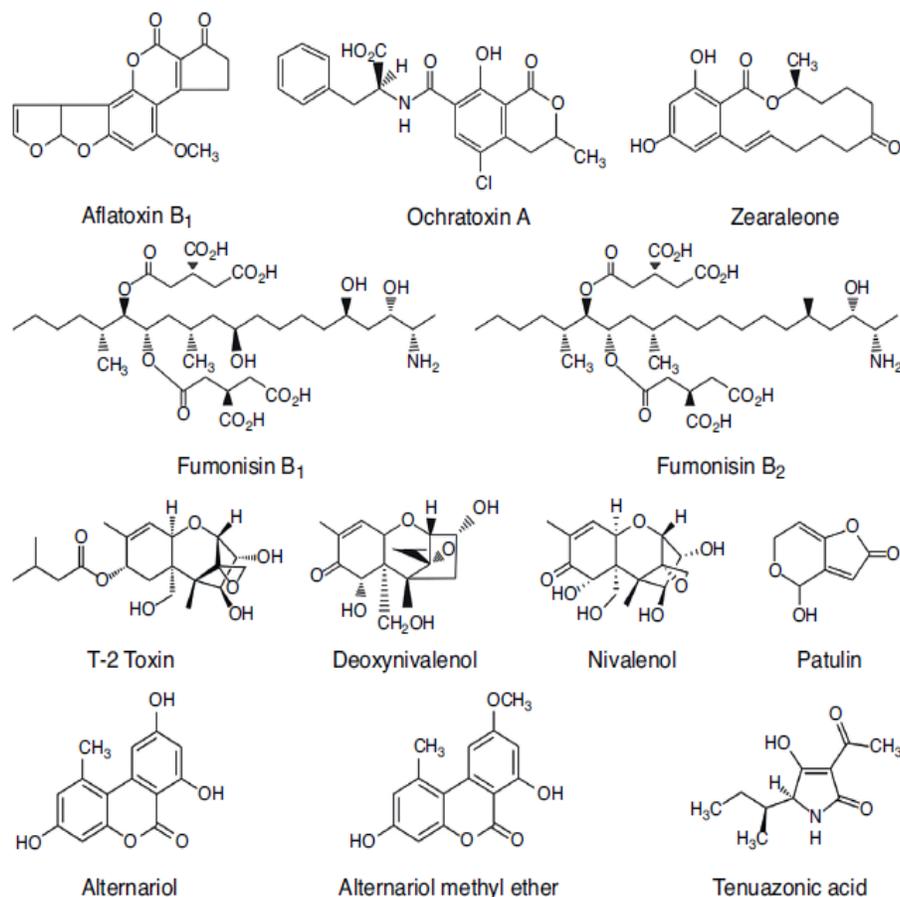


Figura 1. Estructura química de varias micotoxinas. (Patriarca y Fernández, 2017).

La producción de micotoxinas en los alimentos es un fenómeno complejo y multifactorial (Smith et al., 2016), ya que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas (humedad, humedad relativa, temperatura, daño mecánico y condiciones de sequía), químicas (pH, dióxido de carbono, oxígeno, composición del sustrato, biodisponibilidad de micronutrientes, pesticidas y fungicidas) y/o biológicas (variedad de plantas, los hongos presentes, estrés, insectos, interacciones con otros organismos en el sustrato donde coexisten, carga de esporas) se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos, los cuales son utilizados como fuente de energía; por lo que las micotoxinas se suelen formar al final de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria del crecimiento de los hongos toxigénicos (Céspedes, 1997; Gimeno y Martins, 2003; Bryden, 2012; Ferre, 2016; Smith et al., 2016; Patriarca y Fernández, 2017). De igual manera, las prácticas agronómicas inadecuadas, sistemas de cultivo, y las condiciones de recolección a nivel de cosecha (madurez del cultivo, temperatura, humedad y manejo), almacenamiento (estructura, condiciones, humedad y temperatura), manipulación y procesamiento, pueden causar estrés y predisponer a las plantas en el campo a moldear y determinar la gravedad de la contaminación por micotoxinas (Bryden, 2009; Channaiah y Maier, 2014; Wild et al., 2015; Neme y Mohammed, 2017).

Los cultivos en áreas tropicales y subtropicales con clima cálido y húmedo son más susceptibles a la contaminación por las micotoxinas más peligrosas, pues presentan condiciones más favorables para el crecimiento de hongos; en las zonas templadas también se pueden presentar micotoxinas, pero con una ocurrencia menor (Reddy et al., 2010; Nestic et al., 2015; Patriarca y Fernández, 2017). A pesar de los avances en la prevención, a través de la reproducción de variedades resistentes y la mejora de las prácticas agronómicas, pueden

ocurrir concentraciones peligrosas de micotoxinas como resultado de las fluctuaciones climáticas anuales (Bethke et al., 2010; Patriarca y Fernández, 2017).

Dado a la naturaleza ubicua de la microbiota toxigénica, estos compuestos tóxicos se informan como contaminantes naturales de cereales, alimentos y piensos a base de cereales en todo el mundo (Pereira et al., 2014). Las micotoxinas son generalmente química y térmicamente estables (temperaturas superiores a 100°C) y demuestran niveles elevados de bioacumulación (Olivera et al., 2014; Pfliegler, Pusztahelyi, y Pócsi, 2015; Turner et al., 2015; Anfossi, Giovannoli y Baggiani, 2016), por lo tanto, pueden transferirse a los alimentos, incluso después de los pasos de estabilización microbiana, como el calentamiento y la extrusión (Olivera et al., 2014). En consecuencia, también se pueden encontrar en alimentos procesados de origen vegetal o en productos alimenticios de origen animal como leche, huevos, carne y despojos de animales que consumen alimentos contaminados con micotoxinas (Anfossi et al., 2016; Manizan et al., 2018); lo que resulta en la exposición humana, ya sea por consumo directo (plantas, cultivos, frutas y semillas contaminadas) o indirectamente por la ingestión de animales expuestos (pollos, cerdos o vacas, entre otros) (Fig. 2) (Rocha et al., 2014; Laitila, 2015; Hove et al., 2016).

Este proceso desencadena efectos toxicológicos conocidos como micotoxicosis, que pueden ser agudos, crónicos o incluso causar la muerte dependiendo de la gravedad y la duración de la exposición (Ahmad et al., 2014; Manizan et al., 2018). Además de la exposición por ingestión, también se puede presentar por contacto dérmico e inhalación, aunque estas últimas representan un riesgo menor (Marin, ramos, Cano-Sancho y Sanchis, 2013).

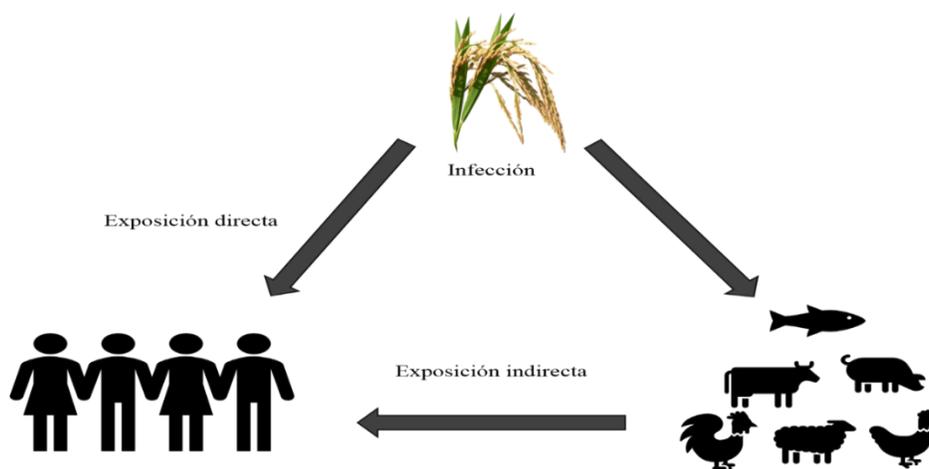


Figura 2. Exposición humana a micotoxinas (Adaptado de Laitila, 2015).

El problema de las micotoxinas es de suma importancia, ya que algunas pueden causar enfermedades autoinmunes, exhibir actividad hormonal y tener propiedades alergénicas, mientras que otros son teratogénicos, carcinógenos, mutagénicos, toxigénicos, nefrotóxicos y hepatotóxicos (Comi e Iacumin, 2013; Rocha et al., 2014; Núñez et al., 2015; Manizan et al., 2018), según el nivel de exposición, siendo particularmente relevantes en el caso del consumo humano de alimentos contaminados (Comi e Iacumin, 2013; Iqbal et al., 2014).

Las micotoxinas tienen efectos principales sobre el ADN, el ARN y la síntesis de proteínas, y su acción proapoptótica puede provocar cambios en las funciones fisiológicas, que incluyen la reproducción, el crecimiento y el desarrollo. Además de estas acciones diferentes, las micotoxinas pueden afectar el sistema gastrointestinal, causar irradiación cutánea, tener efectos hematológicos y reducir el crecimiento (Patriarca y Fernández, 2017; Kharayat y Sing, 2018).

Se han identificado cerca de 500 tipos de micotoxinas (Broom, 2015), sin embargo, solo entre 10 y 15 se consideran de interés para la salud pública basadas en su toxicidad y pérdidas económicas (Turner et al., 2015), como es el caso de aflatoxinas (AF) y Ocratoxina (OTA) (producidas por *Aspergillus* spp.), deoxinivalenol (DON), fumonisinas (FB) y zearalenona

(ZEN) (producidas por *Fusarium* spp.), las más prominentes debido a su alta incidencia en los alimentos (Ashiq 2014; Iqbal et al., 2014; Ahmad et al., 2017; Udomkun et al., 2017).

Los tricotecenos son el grupo principal, y químicamente más diverso, de las tres clases principales de micotoxinas de *Fusarium* spp. (Summerell y Leslie, 2011; Escrivá et al., 2015). Son un grupo complejo de ésteres de alcoholes sesquiterpénicos no volátiles de bajo peso molecular (200-500 Da) químicamente relacionados, que comparten un núcleo tricíclico llamado tricodieno caracterizado por un doble enlace en la posición 9, 10 y un grupo epóxido entre los carbonos 12 y 13, responsable de su toxicidad (Fig. 3) (Grove, 2007; Pestka, 2010; Arunachalam y Doohan, 2013; Wu, Groopman y Pestka, 2014; Patriarca y Fernández, 2017).

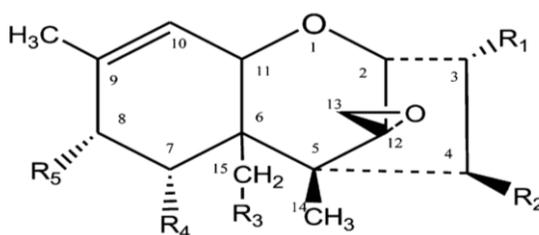


Figura 3. Estructura básica de los tricotecenos (He et al, 2010).

La amplia familia de tricotecenos es extremadamente frecuente y está constituido por más de 200 derivados químicos (Nguyen et al., 2017) clasificados en cuatro subgrupos (A, B, C y D) de acuerdo con su estructura química y por su patrón de sustitución de grupos laterales específicos; de los cuales la mayor toxicidad y frecuencia de ocurrencia pertenecen a los grupos A y B (Patriarca y Fernández, 2017). Los tricotecenos tipo A (Fig. 4) tiene un grupo de sustitución hidroxilo, éster u oxígeno en C-8, incluye la toxina T-2 y toxina HT-2 (Escrivá et al., 2015) y son producidos por los hongos del suelo y los patógenos de las plantas *Fusarium acuminatum*, *F. poae* y *F. sporotrichiodes* (Marin et al., 2013); mientras que el grupo tipo B (Fig. 5) contienen un grupo cetona en C-8 y un grupo hidroxilo C-7 e incluye

el nivalenol (NIV) y el deoxinivalenol (DON) (Escrivá et al., 2015), los cuales son producidos por *F. graminearum* y *F. culmorum* (Nguyen et al, 2017). La concentración de los tricotecenos B que se encuentra en los cereales contaminados es generalmente más alta que la de los tricotecenos A (Patriarca y Fernández, 2017).

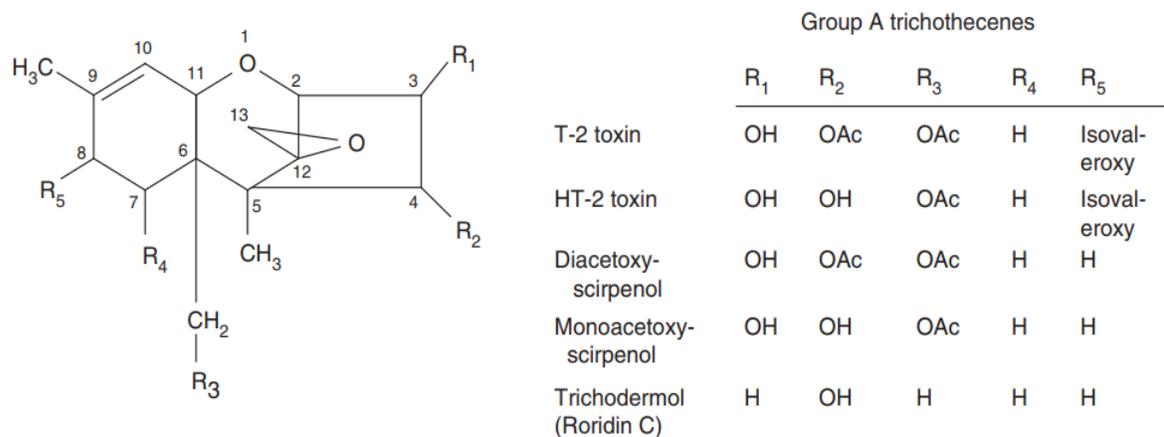


Figura 4. Estructura química de tricotecenos tipo A (Oliveira et al., 2014b).

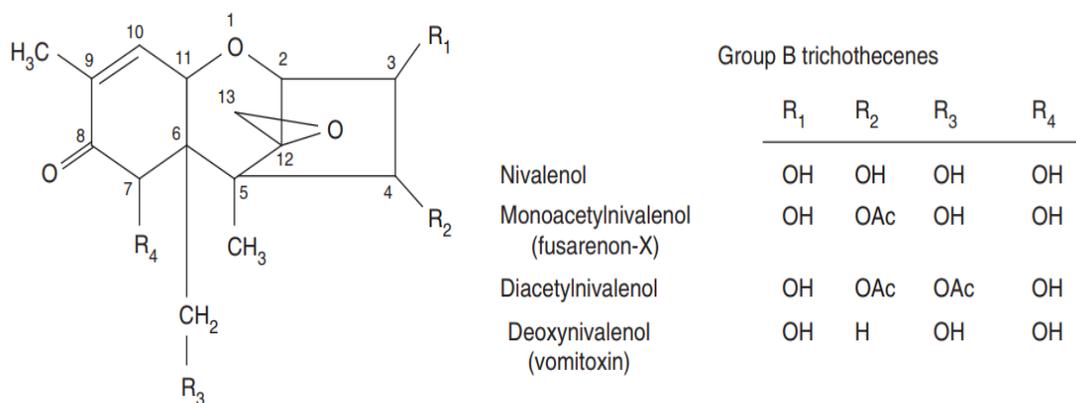


Figura 5. Estructura química de tricotecenos tipo B (Oliveira et al., 2014b).

La síntesis de tricotecenos, comprende una extensa ruta bioquímica que esta mediada por los genes TRI (Fig. 6). La síntesis comienza con la ciclación del pirofosfato de farnesilo, un intermedio metabólico primario derivado del Acetil CoA, para formar un tricodieno por la acción de la tricodieno sintasa regulada por Tri5. El tricodieno, se somete a una serie de

oxigenaciones catalizadas por el citocromo P450 mono-oxigenasa que es codificado por TRI4. TRI4, controla la adición de cuatro oxígenos mediante la hidroxilación en C-2, epoxidación en C-12/C-13, hidroxilación en C-11 e hidroxilación en C-3, para formar el isotrichotriol intermedio. El Isotrichotriol, sufre una isomerización y ciclización no enzimática para formar el isotrichodermol, el primer intermedio biosintético que tiene el núcleo tricíclico y la estructura 12,13-epóxido común a todos los tricotecenos. Durante este proceso, el oxígeno en la posición C-2 se convierte en el oxígeno del anillo pirano y el grupo hidroxilo en C-11 se pierde. El isotrichodermol, se convierte en isotrichodermina mediante una acetiltransferasa codificada por TRI101. Luego se agrega un grupo hidroxilo a C-15 (controlado por TRI11) formando la 15-decalonectrina, que posteriormente se acetila bajo el control de TRI3 produciendo la Calonectrina. La calonectrina, sirve como un sustrato para la biosíntesis de DON, NIV y la toxina T-2, que dependiendo de la expresión de los genes de las cepas de *Fusarium* spp. que las producen, continúan con una ruta bioquímica diferente. En las cepas de *Fusarium* spp. que producen la toxina T-2 y el NIV, la biosíntesis del tricoteceno procede con la hidroxilación C-4, que se cataliza por la monooxigenasa del citocromo P450 codificada por TRI13. En contraste, las cepas de *F. graminearum* que producen DON, carecen de un TRI13 funcional y, por lo tanto, no pueden hidroxilar los tricotecenos en C-4, sin embargo, en estas cepas la mono-oxigenasa FgTRI1 cataliza la hidroxilación de C-7 y C-8 (Alexander, Proctor y McCormick, 2009; Foroud y Eudes, 2009; Kimura et al., 2007; McCormick et al., 2011).



interrumpen la función gastrointestinal y causan muerte celular (Pestka 2010; Yang et al., 2015).

### 2.3.1. Deoxinivalenol (DON)

El DON es el tricoteceno de mayor relevancia debido a su frecuente presencia en los cereales de todo el mundo (Cano et al., 2015) y en especial en las regiones de clima templado (Kovalsky et al., 2016), exhibiendo niveles lo suficientemente altos como para causar efectos adversos en humanos y animales (EFSA, 2004; Commission of the European Communities, 2006; Döll y Dänicke, 2011).

Estructuralmente, DON es un compuesto orgánico polar que contiene 3 grupos hidroxilo libres (-OH), que están asociados principalmente con su toxicidad (Fig. 7) (Nagy et al., 2005; Mishra et al., 2014). Se describe químicamente como 12,13-epoxi-3,7,15-trihidroxitricothec-9-en-8-ona (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>, PM: 296,32) (Döll y Dänicke, 2011) y es soluble en agua y en algunos disolventes polares (metanol acuoso, acetonitrilo y acetato de etilo) (EFSA, 2004). La producción de DON depende de unas condiciones meteorológicas óptimas, como una temperatura de 26 - 30°C y a una actividad de agua (Aw) de 0.995 (Milani, 2013; Patriarca y Fernández, 2017).

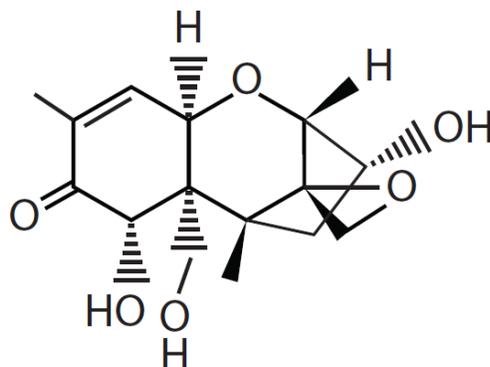


Figura 7. Estructura del DON (Sobroba et al, 2010)

DON es estable a temperaturas altas como 120°C y moderadamente estable a 180°C (Döll y Dänicke, 2011), por lo que no muestra una reducción significativa ante las técnicas de procesamiento de alimentos (Peng et al., 2016; Liao et al., 2018), y persiste en alimentos de origen vegetal y animal como en la carne, la leche y el huevo, obtenido de ganado y aves de corral alimentadas con alimentos contaminados con DON; lo que plantea un problema grave en la actualidad (Deng et al., 2016; Radko et al., 2018). Los seres humanos, están significativamente expuestos al DON, por ejemplo, en un estudio reciente se detectó DON en el 98,7% de las muestras de orina de adultos en el Reino Unido (Nielsen, 2009). Los riesgos potenciales para la salud humana se basan en el estrecho margen entre las dosis de DON que afectan las funciones celulares y las cantidades de DON que pueden consumirse en relación con su ingesta diaria máxima tolerable provisional (IDTMP) (Escrivá, 2015).

Por ende, varios países han establecido medidas urgentes, como el monitoreo continuo y la regulación de los niveles máximos de micotoxinas en productos alimenticios y productos básicos (Van Egmond, Schothorst y Jonker, 2007; Del Ponte, Garda, Badiale, 2012). Según la Comisión Europea (EC, 2017) y la legislación colombiana (Ministerio de Salud y Protección Social, 2013), los valores permisibles para el deoxinivalenol son de 1250 µg/Kg, mientras que para la FAO (FAO, 2003) los valores están en el rango de 300-2000 µg/Kg para cereales no elaborados que no sean de trigo duro, avena y maíz. Como DON es una de las micotoxinas asociadas a alimentos más prevalentes y peligrosas, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos de Aditivos en Alimentación ha propuesto una ingesta diaria máxima tolerable provisional (IDTMP) de 1 µg/Kg de peso corporal por día (JECFA, 2011; Escrivá et al., 2015), y una dosis de referencia aguda (ARFD) de 8 µg/Kg de peso corporal (EFSA, 2013; Liu et al., 2016).

La toxicidad de DON en humanos y animales ocurre de una manera dependiente de la dosis y frecuencia de exposición, y se manifiesta en una serie de trastornos, que incluyen neurotoxicidad, inmunotoxicidad, toxicidad reproductiva, embriotoxicidad, carcinogénesis, mutagénesis, citotoxicidad; y es considerado como teratógeno por la Organización Mundial de la Salud (Del Ponte et al., 2012; Islam et al., 2013; Singh et al. 2015; Yang et al., 2017; Fang et al., 2018). Por otro lado, una revisión de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) incluyó a DON como carcinógeno humano del Grupo 3 (no clasificable) debido a evidencia inadecuada de carcinogenicidad animal y falta de investigación en humanos (IARC, 2002; Payros et al., 2017).

La toxicidad de DON se basa en su capacidad para cruzar las barreras biológicas y afectar las funciones y la viabilidad de las células que forman dichos sistemas de órganos (Maresca, 2013; Escrivá et al., 2015). Una vez ingerido, DON primero interactúa con el epitelio gastrointestinal (Smith et al., 2018), en donde, gracias a su carácter anfipático y lipófilico (Escrivá et al., 2015), se absorbe casi por completo y el intestino delgado proximal por difusión simple (Turner et al., 2008; Bensassi et al., 2012) y, en consecuencia, puede inducir toxicidad local y cruzar esta barrera para llegar al torrente sanguíneo (Smith et al., 2018; Deng et al., 2016) y así causar efectos adversos sobre otros órganos como el timo, el bazo, el corazón, el hígado y el cerebro (Escrivá et al., 2015; Huang, 2019b; Maresca, 2013; Rocha et al., 2014; Sobrova et al., 2010). DON afecta principalmente las células del sistema gastrointestinal, inmune, reproductivo y neuroendocrino (Escrivá et al., 2015; Pestka, 2010).

El hígado, es el órgano más importante en la ruta metabólica de DON, pues es responsable de su detoxificación mediante la formación de DON-glucuronido (DON-GlcA) por UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) y de DON-3-sulfato por conjugados de sulfato en la posición C-3 en humanos y animales (Favero 2018; Peng et al., 2016; Smith et al., 2017;

Warth et al. 2012). Además, la concentración de la toxina por lo general se encuentra en el nivel más alto en el hígado después de su absorción (Zhang et al., 2018). Por lo tanto, el enfoque principal de varios estudios ha sido orientado a evaluar los efectos tóxicos de DON en el hígado (Peng et al., 2016).

### **2.3.1.1. Citotoxicidad de DON y Apoptosis**

DON tiene un efecto citotóxico complejo y distintivo sobre las células humanas, que dependen de la concentración y del tipo de célula ensayada (Li et al., 2014b; Krajarng et al., 2015; Wang et al., 2016). La naturaleza anfipática de DON le permite atravesar fácilmente las membranas celulares e interactuar con diferentes orgánulos como los ribosomas, mitocondrias y retículo endoplásmico, lo que los convierte en orgánulos diana de esta micotoxina (Wu, et al., 2014b). Una de las manifestaciones del estrés oxidativo es la producción de radicales libres (ROS), incluyendo el anión superóxido ( $O_2^-$ ), el radical perhidroxi ( $HOO\cdot$ ) y el radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ), formados durante una variedad de reacciones bioquímicas y funciones celulares. Dado que estructuralmente el DON cuenta con 3 radicales ( $OH\cdot$ ) libres, puede generar ROS intercelular, e inducir estrés oxidativo (Mishra et al., 2014; Kang et al., 2019; Yang et al., 2019), provocando así, la inhibición de la síntesis de proteínas, de ADN y de ARN, alteración de la función mitocondrial; la división, señalización y diferenciación celular; la integridad de la membrana y conducir a la muerte celular por apoptosis o necrosis (Pestka y Smolinski, 2005; Rocha et al., 2005; Pestka, 2010; Nogueira et al. 2011; Ran et al., 2013; Li et al., 2014a; Li et al., 2014b). El estrés oxidativo ha sido propuesto como un posible mecanismo de la hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, toxicidad intestinal y genotoxicidad (Zhang et al., 2009; Yang et al., 2019).

Las vías más relevantes por las cuales el DON causa toxicidad celular, involucran la vía ribosómica, la vía mitocondrial y la vía del retículo endoplásmico (Fig. 8).

### **Vía ribosómica**

Una vez el DON ingresa a las células, se acopla al ribosoma por la unión del grupo 3-hidroxi del DON al sitio-A de la subunidad 60s, lo que genera un cambio conformacional y daño del ribosoma; inhibiendo así la etapa de inicio, elongación y terminación de la síntesis de proteínas (Pierron et al. 2016a; Payros et al., 2016). Este mecanismo se ha denominado "respuesta al estrés ribotóxico" (Petska 2008; Wang et al., 2012; Yuang et al., 2018).

Las proteínas quinasas PKR (asociada a ARN de doble cadena) y HCK (quinasa de células hematopoyéticas) son dos mediadores críticos de la respuesta al estrés ribotóxico inducida por el DON (Pestka, 2010; Wang et al., 2014). El daño ribosómico genera el reclutamiento y fosforilación de PKR y HCK, que funcionan como integradores de señales para la estimulación y fosforilación de otras quinasas como las MAPK: JNK, ERK y p38 (Pestka 2008, 2010; Walle et al., 2010; Payros et al., 2016; Liao et al., 2018). La activación de p38, puede fosforilar y activar la p53, y a su vez, la p53 regula la activación de Bax y de la caspasa-8, ocasionando alteraciones del proteosoma o la apoptosis (Fig. 8-1) (Pestka 2008; Payros et al., 2016; Yuang et al., 2018).

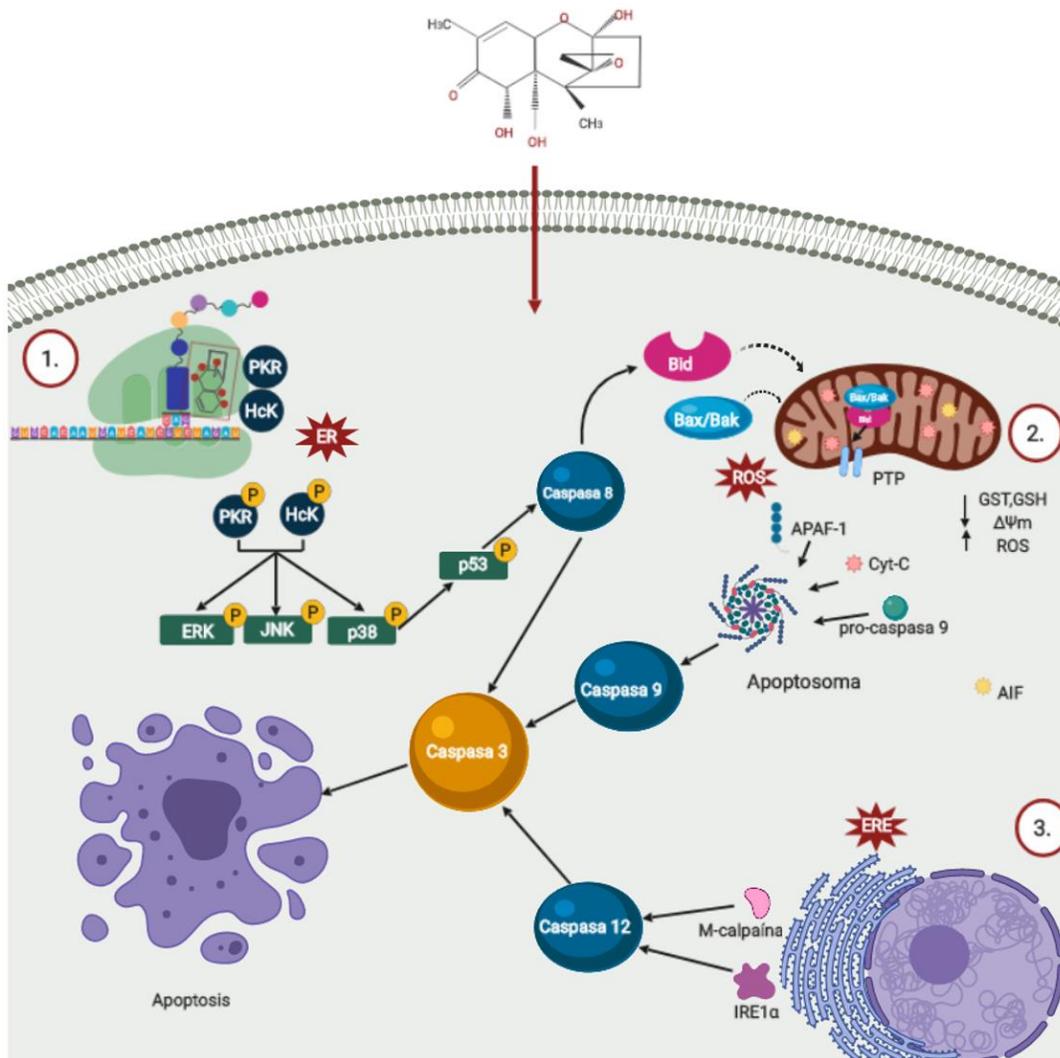


Figura 8. Mecanismo molecular de la toxicidad de DON. Las flechas rojas indican el sitio de acción de toxicidad del DON, las líneas continuas indican activación y las flechas discontinuas indican translocación.

### Vía Mitocondrial

Además de los ribosomas, se considera que las mitocondrias son dianas de los tricotecenos (Bin et al., 2014; Li et al; 2014b; Liu et al., 2016; Wu et al., 2017). El DON promueve el estrés oxidativo aumentando los niveles de ROS intracelular, lo que induce una disfunción mitocondrial, peroxidación lipídica y un cambio en el estado antioxidante de las células, reduciendo la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión-S-transferasa (GST),

glutación reducido intracelular (GSH), la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT) (Hou et al. 2013; Wu et al., 2017; Wu et al., 2014b), lo que finalmente conduce a la apoptosis celular (Kang et al., 2019; Mishra et al., 2014; Yang et al., 2019).

Varios eventos clave en la apoptosis se centran en las mitocondrias, como los cambios en el transporte de electrones, la pérdida de potencial transmembrana mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales apoptogénicas tras la permeabilización de la membrana mitocondrial (MMP) (Bensassi et al., 2012; Kroemer et al., 2007;). La exposición a DON provoca la activación de las proteínas proapoptóticas Bax/Bak y Bid en las mitocondrias (Liao et al., 2018; Pestka 2010; Wang et al., 2016). Cuando Bid es activada por la caspasa-8, interactúa con Bax, causándole a éste último, un cambio conformacional que le permite insertarse en la membrana mitocondrial para formar un poro en la membrana mitocondrial externa (OMM) (Bensassi et al, 2012; Reed, 2006; Zhang et al., 2015; Wang et al., 2016). Además, se demostró que Bax, favorece la apertura de un poro de transición de permeabilidad de alta conductancia (PTP) en la membrana mitocondrial interna (IMM), genera la disipación del potencial de membrana ( $\Delta\Psi_m$ ) y favorece la MMP (Bensassi et al, 2012). Esto permite la liberación de numerosas moléculas del espacio intermembrana, como el Citocromo C (Cyt-C) y otros promotores de apoptosis como AIF (Huang et al., 2019b; Liao et al., 2018; Pestka, 2010; Rasheed et al., 2017; Wang, 2016).

La salida de Cyt-C hacia el citoplasma es fundamental para la activación de la apoptosis y constituye el punto de no retorno de la muerte celular. Una vez en el citoplasma, el Cyt-C se une al APAF-1 y a la pro-caspasa-9 para formar el apoptosoma y activar la caspasa 9, una caspasa iniciadora, lo que lleva a la activación de caspasas ejecutoras como la Caspasa-3 desencadenando las últimas fases de la apoptosis (Bensassi, et al., 2012; Wang, 2016). La

Caspasa-3 entra al núcleo, corta la Lamin-A y rompe la capa de fibra nuclear y concentra la cromatina nuclear, lo que finalmente conduce a la apoptosis (Fig.8-2) (Wu et al., 2014b).

### **Vía del retículo endoplásmico**

El retículo endoplásmico (ER) es crítico para el plegamiento y la secreción de proteínas, la homeostasis del calcio y la biosíntesis de lípidos. Bajo diversas condiciones, llamadas estrés de ER, el plegamiento de proteínas en el ER se deteriora, lo que lleva a la acumulación de proteínas mal plegadas que puede dañar irreparablemente las funciones celulares, y así desencadenar las vías de muerte celular (Benbrook y Long, 2012; Chaudari et al., 2014; Schönthal, 2012).

La exposición a DON, puede inducir estrés en el ER, lo que lleva a la activación de un mecanismo celular específico llamado respuesta de proteínas no plegadas (UPR) (Benbrook y Long, 2012; Katika et al., 2012; Petska, 2010; Schönthal, 2012). La UPR, puede regular la expresión de proteínas asociada al ER, como IRE1 $\alpha$ , que puede desencadenar la apoptosis por la activación de la quinasa JNK y caspasas (Arunachalam y Doohan, 2013; Liao et al., 2018). Así mismo, DON activa las proteínas de unión al calcio, como la M-calpaína y la calcineurina (Katika et al., 2015; Liao et al., 2018). La M-calpaína, participa en la apoptosis mediada por RE mediante la activación de la caspasa-12. Se ha propuesto que la caspasa-12 activada, puede inducir la activación de la caspasa-9, y esta a su vez, activa la caspasa-3 y finalmente se produce la apoptosis (Fig. 8-3) (Katika et al., 2012; Liao et al., 2018; Schmeits et al., 2014).

## **Apoptosis**

La apoptosis, es la forma más común de muerte celular programada en la que una célula sufre la autodestrucción. Es un proceso estrechamente regulado y altamente conservado mediante el cual se realiza la eliminación ordenada y eficiente de las células que ya no son necesarias o potencialmente perjudiciales, como las que presentan daño en el ADN, previniendo así la carcinogénesis (Redza y Averill, 2016; Yang et al., 2019).

La apoptosis puede ser desencadenada por una variedad de señales extrínsecas e intrínsecas, que incluyen diferentes tipos de estrés, como ROS, RNS, agentes que dañan el ADN, choque térmico, infección viral e hipoxia. La exposición a xenobióticos como plaguicidas, contaminantes ambientales y fármacos quimioterapéuticos también puede desencadenar la apoptosis, que a menudo está mediada por ROS. Luego de un ataque tóxico, las diferencias entre un tipo de célula u otro, son determinantes importantes del destino celular, que definen si las células sobrevivirán o morirán por apoptosis (Flusberg y Sorger, 2015; Orrenius et al., 2011; Palapati y Averill, 2012; Redza y Averill, 2016).

El proceso de apoptosis se desarrolla a través de una compleja cascada que involucra características morfológicas y bioquímicas características. Los eventos tempranos de la apoptosis incluyen frecuentemente la disminución del volumen celular, la contracción de la membrana del citoplasma, la pérdida de contacto con la matriz celular, la condensación de la cromatina y la marginación en la membrana nuclear, la condensación nuclear, así mismo, la externalización de la fosfatidilserina es uno de los primeros eventos bioquímicos en el proceso apoptótico de la mayoría de las células. Por otro lado, los eventos tardíos de la apoptosis incluyen, la modificación ultraestructural de los orgánulos citoplasmáticos, la reorganización del citoesqueleto, la fragmentación nuclear y de la cromatina, la formación de vesículas en la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos que son

digeridos mediante fagocitosis por células vecinas o macrófagos. Esto resulta en la eliminación de las células moribundas con un daño mínimo a las células y tejidos circundantes (Elmore, 2007; Gordeziani et al., 2017; Grilo y Mantalaris, 2019; Kondratskyi et al., 2015; Muganda, 2015; Pistritto et al., 2016; Redza y Averill, 2016). Estos cambios pueden ser identificados por medio de ensayos para cuantificar las células con apoptosis tardía o temprana, como se muestra en la tabla 1.

Dependiendo del mecanismo de inicio, las vías de señalización que conducen a la apoptosis pueden dividirse en dos vías centrales: la vía extrínseca que involucra receptores de muerte localizados en la superficie celular y la vía intrínseca que involucra las mitocondrias. Sin embargo, a pesar de las diferencias en los mecanismos de iniciación y las moléculas involucradas, ambas vías pueden converger para producir las alteraciones características de la apoptosis (Kondratskyi et al., 2015; Pistritto et al., 2016).

Tabla 1.

*Ensayos para la detección de la etapa temprana y tardía de la apoptosis.*

<b>Etapa de la apoptosis</b>	<b>Marcador de apoptosis</b>	<b>Medida de detección</b>
Temprana	Externalización de la fosfatidil-serina	Annexina V y análisis FCAS
	Activación de caspasas	Ensayos enzimáticos/ Western blot
	Escisión de sustratos de caspasa	Western blot para sustratos escindidos: PARP
	Alteraciones mitocondriales	DIOC6
Tardía	Escisión del ADN Inter-histona	Escalonamiento del DNA
	Rompimiento de la cadena del ADN <i>in situ</i>	TUNEL
	Disminución del contenido de ADN	Tinción con yoduro de propidio y análisis FACS
	Morfología	Microscopía Electrónica

Adaptado de Cook y Poole, (1999).

En las vías de muerte celular apoptótica, los dos grupos más importantes de proteínas que participan en la apoptosis, son las caspasas y la familia de proteínas Bcl-2 (linfoma de células B-2) (McIlwain et al., 2015; Taylor et al., 2008). Las caspasas son endoproteasas dependientes de la cisteína que catalizan la ruptura del enlace peptídico. La mayoría de las caspasas conocidas tienen un papel en la apoptosis y pueden dividirse en dos grupos: caspasas iniciadoras (por ejemplo, caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-10) y caspasas efectoras (por ejemplo, caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7) (Shalini et al., 2015). Las caspasas iniciadoras activan las caspasas efectoras, que a su vez realizan gran parte de la proteólisis y alteraciones del ADN observada en la apoptosis (Kondratskyi et al., 2015).

Las proteínas de la familia Bcl-2 están muy involucradas en la regulación de la apoptosis con actividades pro y anti-apoptóticas. El grupo antiapoptótico comprende Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1, Bcl2A1 y Bcl-B, y están asociados típicamente con membranas celulares, nucleares o mitocondriales. El grupo proapoptótico está compuesto por Bax, Bak, Bid, PUMA, NOXA y Bmf (Pistritto et al., 2016; Redza y Averill, 2016; Taylor et al., 2008).

Por lo anterior, varios estudios han evaluado los efectos de la exposición a DON en líneas celulares humanas (Dinu et al., 2011). La mayoría de estos estudios evaluaron los mecanismos celulares y moleculares de citotoxicidad inducidos por DON en las células del sistema inmune, células hepáticas, células renales y células intestinales (Königs et al., 2007, 2008; Kouadio et al., 2005, 2007; Pestka et al., 2004; Sun et al., 2002).

#### **2.4.Línea Celular HepG2**

Durante las últimas décadas, el desarrollo y uso de cultivos de células de mamíferos han permitido la detección y estimación preliminar de la toxicidad de las micotoxinas, así como para evaluar las relaciones estructura-actividad y para dilucidar los modos de acción de las

toxinas a nivel bioquímico relacionados con los orgánulos celulares (Cetin, 2005; Petska 2008). Las líneas celulares de leucocitos, macrófagos, monocitos, células B y T, y fibroblastos, son los tipos celulares más sensibles a DON (Pinton y Oswald, 2014), así como las células de los órganos que participan en la vía de absorción, entre los que se encuentran, el intestino y el hígado, como la línea celular HepG2. Por ende, los hepatocitos humanos constituyen uno de los modelos estándar más relevantes en estudios in vitro para estudios de toxicidad y metabolismo de DON (Smith et al., 2018).

La línea celular de hepatoblastoma humano (HepG2). Esta línea celular fue derivada de biopsias de hígado de un varón caucásico de 15 años con un carcinoma hepatocelular diferenciado. Las células HepG2 son células altamente proliferativas que se han desarrollado con éxito en sistemas de cultivo a gran escala. Muestran una morfología epitelial en condiciones de cultivo. Además, se han descrito como el mejor modelo de hígado celular para reflejar el metabolismo de los xenobióticos (Costantini et al., 2013; Donato et al., 2014; Sobral, 2018 Zhang et al., 2009).

## **2.5. Ensayo MTT**

La citotoxicidad se refiere a la capacidad de una sustancia química para dañar las células vivas, en particular al comprometer características funcionales y estructurales que son esenciales para la supervivencia, proliferación o función celular (Tolosa et al., 2015; Vinken y Blaauboer, 2017). Las normas ISO\_ 10993-5, exponen los parámetros para la determinación de la citotoxicidad mediante ensayos cuantitativos que miden el daño celular, la proliferación celular y aspectos específicos del metabolismo celular, mediante técnicas que incluyen el rojo neutro, el XTT y el MTT, entre otros (ISO, 2009).

El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio), es un método colorimétrico que se basa en la capacidad de las células viables para reducir una sal de tetrazolio (amarillo) en un formazán (azul-púrpura) (Fig. 9) (ISO, 2009; Vinken y Blaauboer, 2017).

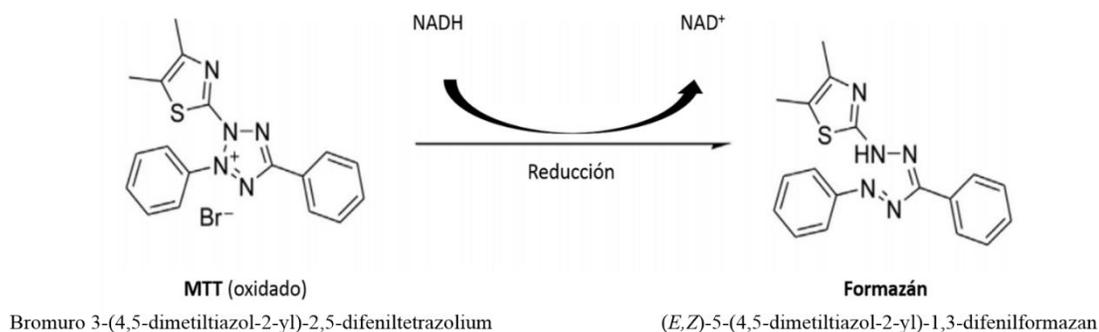


Figura 9. Reducción de la sal de tetrazolio MTT a Forman (Adaptado por Garzón, 2019)

Aunque el mecanismo exacto de la reacción de reducción de MTT en formazán no se conoce bien (Kupcsik, 2011; Tolosa et al. 2015), se sabe que, debido a sus grupos laterales lipófilos y su carga neta positiva, el MTT puede pasar la membrana celular (Stepanenko y Dmitrenko, 2015; Präbst, et al., 2017) y ser reducido por células viables (metabólicamente activas) mediante enzimas mitocondriales o plasmáticas celulares como las oxidorreductasas, deshidrogenasas, oxidasas y peroxidasas usando NADH, NADPH, succinato o piruvato como donadores de electrones o co-sustrato (Berridge, Herst y Tan, 2005; Stepanenko y Dmitrenko, 2015; Präbst, et al., 2017), lo que resulta en la formación de cristales de formazán que irradian de las células en unas pocas horas (Kupcsik, 2011). El formazán, se acumula dentro de las células, ya que no puede pasar a través de las membranas celulares intactas, pero al eliminar el medio acuoso y solubilizarlo con DMSO (dimetilsulfóxido) o isopropanol, el producto solubilizado se puede medir espectrofotométricamente a una longitud de onda

entre 570 y 590 nm (Kupcsik, 2011; McGaw et al., 2014; Hundie et al., 2016; Präbst, et al., 2017).

La capacidad de las células para reducir el MTT proporciona una estimación de la integridad y actividad mitocondrial, que a su vez puede interpretarse como una medida de la viabilidad y/o el número de células (Vinken y Blaauboer, 2017), por lo que la densidad celular se puede establecer proporcional a la concentración del producto coloreado resultante en un cierto rango (Berridge et al., 2005).

## **2.6. Antecedentes**

### **2.6.1. Cuantificación de DON en Colombia**

A nivel nacional son muy pocos los estudios realizados sobre micotoxinas. Dichos estudios se basan, en su mayoría, en revisiones bibliográficas de micotoxinas (Chicagui y Echeverría, 2015; INS, 2015; Martínez y Londoño, 2017; Prado, 2018; Serrano y Cardona, 2015) y en la determinación de micotoxinas en alimentos de consumo humano y animal (Castilla et al., 2011; Díaz y Sánchez, 2015; Morris, 2011).

En cuanto a la incidencia de micotoxinas en cereales y sus derivados, se encuentran registros de micotoxinas en Antioquia, Cesar, Cundinamarca, Bolívar, Atlántico, Magdalena, Norte de Santander, Amazonas, Caldas y La Guajira (Tabla 2). Las micotoxinas que se destacan en estos estudios son Aflatoxinas (AFLA), Zearalenona (ZEA), Fumonisin (FUM) y DON. Las aflatoxinas son las micotoxinas más reportadas en Colombia, siendo el maíz y sus derivados los productos de mayor estudio y prevalencia, seguidos del arroz (Tabla 2).

Tabla 2.  
*Antecedentes nacionales de micotoxinas en cereales.*

Departamento	Alimento	Micotoxina	Referencia
Antioquia	Maíz Sorgo Soya	AFLAs	Díaz y Céspedes, 1997. Perilla y Díaz, 1998.
Amazonas	Maíz Arroz	AFLAs ZEA DON FUM	Díaz et al., 2015.
Atlántico	Maíz Arroz Sorgo Soya	AFLAs	Morris, 2011.
Bolívar	Maíz Arroz Sorgo Soya	AFLAs	Morris, 2011. Díaz y Céspedes, 1997. Castilla et al., 2011.
Caldas	Arroz Pan Arepa	AFLAs	Martínez, Moreano y Ocampo, 2019. Martínez, Taborda y Rosero, 2015.
Cesar	Maíz Arroz	AFLAs	Morris, 2011.
Cundinamarca	Maíz Arroz Sorgo	AFLAs ZEA FUM	Acuña, Diaz y Espitia, 2005. Díaz, Perilla y Rojas, 2001. Ramírez y Grose, 1995. Díaz y Céspedes, 1997. Perilla y Díaz, 1998.
La Guajira	Maíz Arroz	AFLAs	Morris, 2011.
Magdalena	Maíz Arroz	AFLAs	Morris, 2011.
Norte de Santander	Productos de consumo infantil	AFLAs DON ZEA	Rojas y Wilches, 2012

DON, a pesar de ser una de las micotoxinas más relevantes en la actualidad, es una de las que menos interés ha despertado entre la comunidad científica nacional, pues son muy pocos los reportes de esta micotoxina en cereales (Fig. 10). Díaz et al., (2015), detectaron esta micotoxina en una concentración de 3.6-13.0 µg/kg en muestras de arroz de poblaciones indígenas del Amazonas. De igual forma, Rojas y Wilches (2012), reportaron que el 36.67%

de las muestras de alimento de consumo infantil fueron positivas para DON en rangos que oscilan entre 231.10 y 2273.04  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , valores que superan el máximo permisible por la Unión Europea (200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

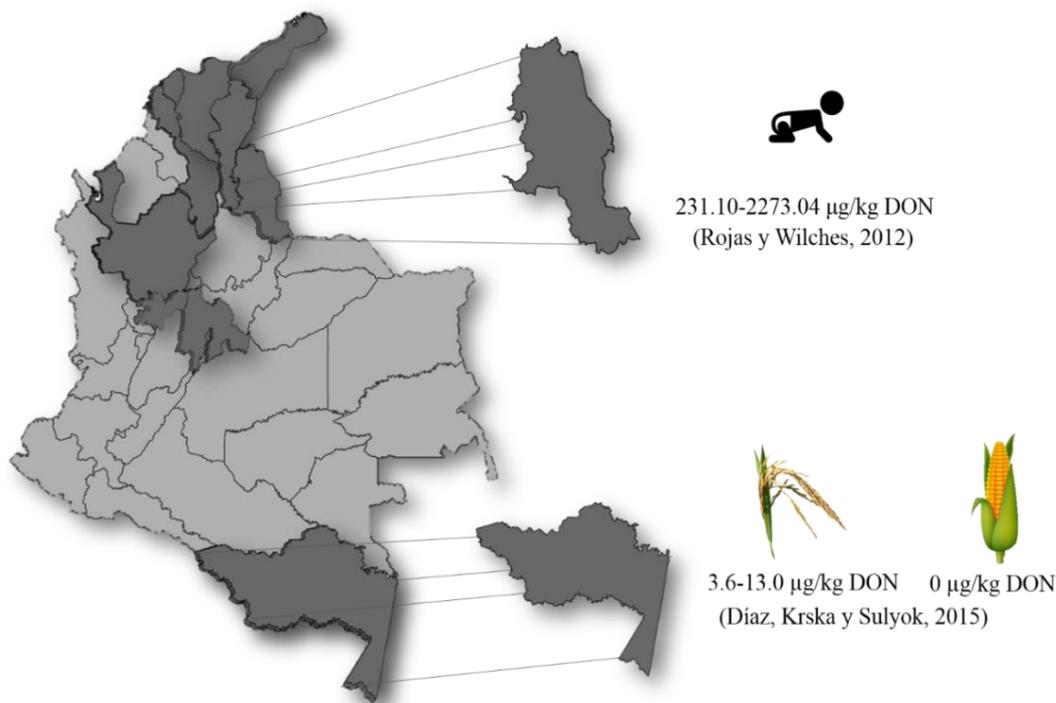


Figura 10. Registro de micotoxinas en cereales por departamento y estudios del DON.

### 2.6.2. Citotoxicidad del DON

A nivel internacional, diferentes estudios sobre la citotoxicidad *in vitro* de DON se han llevado a cabo en diversas células humanas (Tabla 3). Entre los tipos de células estudiadas, se destacan las células de los órganos que participan en la vía de absorción, incluyendo el hígado, el intestino y el colon, así como las células pertenecientes al linaje hematopoyético. Dichos estudios se basan en determinar la concentración en la cual el DON puede inhibir el 50% de la población celular evaluada ( $\text{CI}_{50}$ ). El  $\text{CI}_{50}$  se ha presentado en un rango muy amplio y dependiente del tipo de célula, la concentración de DON y la finalidad del estudio. Así

mismo, se han evaluado las alteraciones fisiológicas de las células expuestas al DON, entre las que se encuentran el estado oxidativo, síntesis de proteínas, genotoxicidad y muerte celular por apoptosis (Tabla 2).

A nivel nacional, no hay estudios sobre la citotoxicidad del DON en líneas celulares humanas que puedan contribuir al conocimiento de los mecanismos de toxicidad de esta micotoxina, y a su vez, establecer una posible relación con problemas en la salud de la población expuesta.

Tabla 3.  
*Estudios citotóxicos de DON.*

<b>País</b>	<b>Tipo de célula</b>	<b>Concentración de exposición</b>	<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>Resultado</b>	<b>Referencia</b>
Alemania	Hepatocitos primarios humanos HepG2	0.1–100 $\mu\text{M}$	6.0 $\pm$ 2.2 $\mu\text{M}$ 41.4 $\pm$ 3.7 $\mu\text{M}$	Citotoxicidad, disminución de LDH y activación de Caspasas.	Königs et al. (2008)
Alemania	HepG2	1 and 10 $\mu\text{M}$	1.89 $\mu\text{M}$	Alteración de la expresión de ATF3	Nielsen et al. (2009)
Romania	HepG2	1-5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	Incremento de estrés oxidativo, generación de ROS.	Bodea et al. (2009)
Romania	HepG2	1-5 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$	Incremento de ROS, SOD, GPx, CAT, G6PD and GST, disminución de GSH	Dragomir et al. (2009)
China	HepG2	3.75–60 $\mu\text{M}$	N.E.	Daño del DNA, incremento de ROS por estrés oxidativo	Zhang et al. (2009)
España	HepG2	1.25- 15 $\mu\text{M}$	10.15 $\pm$ .0.41 $\mu\text{M}$	Detención del ciclo celular en la fase G2/M	Juan-García et al. (2018)
Francia	Caco-2	5–40 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$	Estrés oxidativo	Kouadio et al. (2005)
Francia	Caco-2	0.01–0.5 $\mu\text{M}$	>10 $\mu\text{M}$	Genotoxicidad	Bony et al. (2006)

España	Caco-2	0.25-30 $\mu\text{M}$	3.30 - 10 $\mu\text{M}$	Incremento de la citotoxicidad	Cano-Sancho et al. (2015)
USA	CHO-K1	0.04- 20 $\mu\text{g/ml}$	1.15 - 0.27 $\mu\text{g/ml}$	Incremento de la citotoxicidad	Cetin y Bullerman. (2005)
Túnez	HT 29 Carcinoma de colon humano	2.5–15 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	No aumento la generación de ROS, aumento el daño del DNA y la apoptosis	Bensassi et al. (2009)
Túnez	HCT116 Carcinoma colonrectal	100 $\mu\text{M}$	150 $\mu\text{M}$	Disminución de viabilidad, activación del proceso apoptotico vía mitocondria	Bensassi et al. (2014)
Romania	Hek-293	2.5-17.5 $\mu\text{M}$	10 $\mu\text{M}$	Alteración del sistema antioxidante	Dinu et al. (2011)
España	K562 Eritroleuquemia	100 -280 $\mu\text{M}$	84 $\mu\text{M}$	Incremento de apoptosis y citotoxicidad	Minervini et al. (2004)
China	Linfocitos de sangre periférica humana	6.25–500 ng/mL	101.4 - 103.7 ng/mL	Incremento de LPO, Cambio de los niveles de 8-OHdG y ROS	Yang et al. (2014)
China	PC12	100-2000 ng/mL	N.E.	Apoptosis por vía mitocondrial	Wang et al. (2016)
Italia	U937	0–200 $\mu\text{M}$	>100	Producción de ROS, disminución de la actividad de GPx, GSH.	Costa et al. (2009)

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto citotóxico del deoxinivalenol sobre líneas celulares humanas y su presencia en el arroz cultivado en Cúcuta y El Zulia.

#### 3.2. Objetivos Específicos

1. Aislar los hongos micotoxigénicos propios del arroz en cultivo procedente de Cúcuta y El Zulia.
2. Cuantificar el deoxinivalenol presente en el arroz en cultivo procedente de Cúcuta y El Zulia.
3. Reconocer el efecto citotóxico del deoxinivalenol sobre la morfología y proliferación celular en la línea celular HepG2.
4. Determinar la inducción de la apoptosis del deoxinivalenol en células polimorfonucleares humanas por citometría de flujo.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Área de Estudio

El área de estudio comprendió los municipios de Cúcuta y El Zulia ubicados en la subregión oriental del departamento Norte de Santander (Fig. 11). El municipio de Cúcuta, se encuentra en una altitud media de 320 m.s.n.m., presenta un clima cálido – muy seco, con un promedio de lluvia total anual de 878 mm; la temperatura promedio es de 25.5°C. La humedad relativa del aire oscila durante el año entre 62 y 77 %, siendo mayor en los meses de noviembre y diciembre y la menor, hacia mitad de año (IDEAM, s.f.). Por su lado, el municipio de El Zulia se encuentra a una altitud de 220 m.s.n.m., y presenta una temperatura media de 28°C; no hay datos climatológicos oficiales para éste municipio debido a la falta de bases meteorológicas (Alcaldía municipal de El Zulia, 2018).

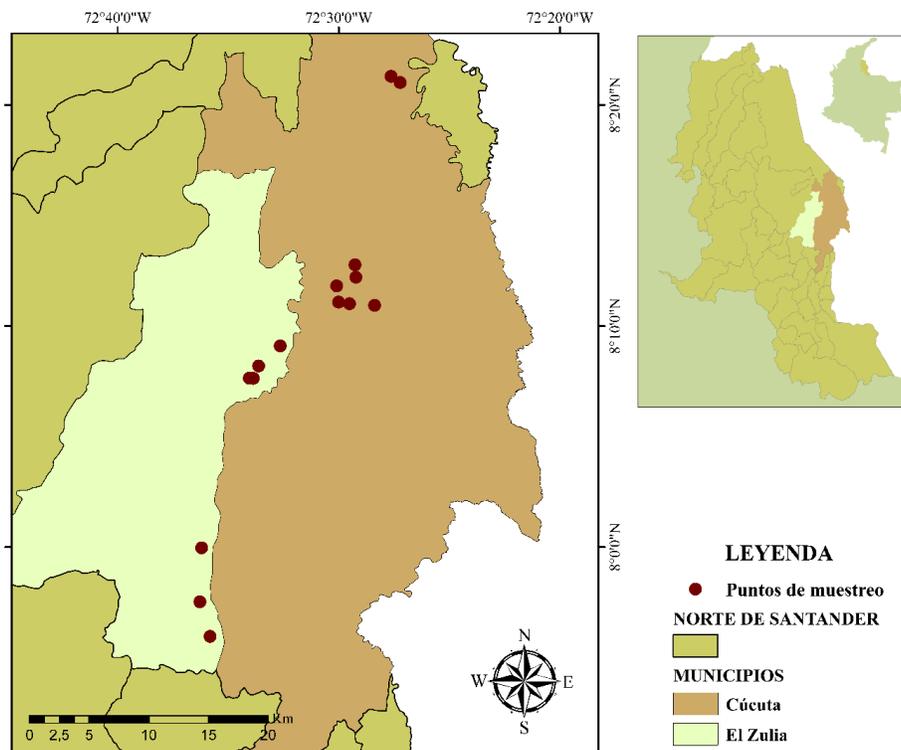


Figura 11. Área de estudio y puntos de muestreo.

## 4.2.Muestras

Las muestras fueron procedentes de cultivos de arroz del municipio de Cúcuta y El Zulia. Se tomaron 8 muestras de Cúcuta y 7 de El Zulia, para un total de 15 muestras de arroz en cultivo (Fig. 11 y Tabla 4). Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN) de la Universidad de Pamplona, en donde fueron almacenadas en bolsas de papel absorbente hasta su procesamiento y análisis.

*Tabla 4.*  
*Georreferenciación de los puntos de muestreo del arroz cultivado.*

Municipio	Puntos de muestreo	Latitud	Longitud
Cúcuta	1	8,2129	-72,48769
Cúcuta	2	8,20357	-72,48704
Cúcuta	3	8,18232	-72,47289
Cúcuta	4	8,35033	-72,4536
Cúcuta	5	8,18358	-72,49181
Cúcuta	6	8,19698	-72,50144
Cúcuta	7	8,1848	-72,50006
Cúcuta	8	8,35502	-72,46046
El Zulia	9	7,93275	-72,59691
El Zulia	10	8,12733	-72,56441
El Zulia	11	8,15176	-72,54404
El Zulia	12	8,12743	-72,56733
El Zulia	13	8,13665	-72,56031
El Zulia	14	7,99953	-72,60328
El Zulia	15	7,95885	-72,6046

## 4.3.Aislamiento e Identificación de Hongos

### 4.3.1. Aislamiento de hongos de las muestras de arroz

Para el aislamiento e identificación de hongos se realizaron tres metodologías, como se describe a continuación: (a) reconocimiento de hongos control, (b) reconocimiento de hongos de superficie del grano y (c) reconocimiento de hongos a profundidad del grano, la aplicación

de las tres metodologías permitió descartar los contaminantes fúngicos atmosféricos (A) y determinar los propios (B, C) de las 15 muestras de arroz (Fig. 12).

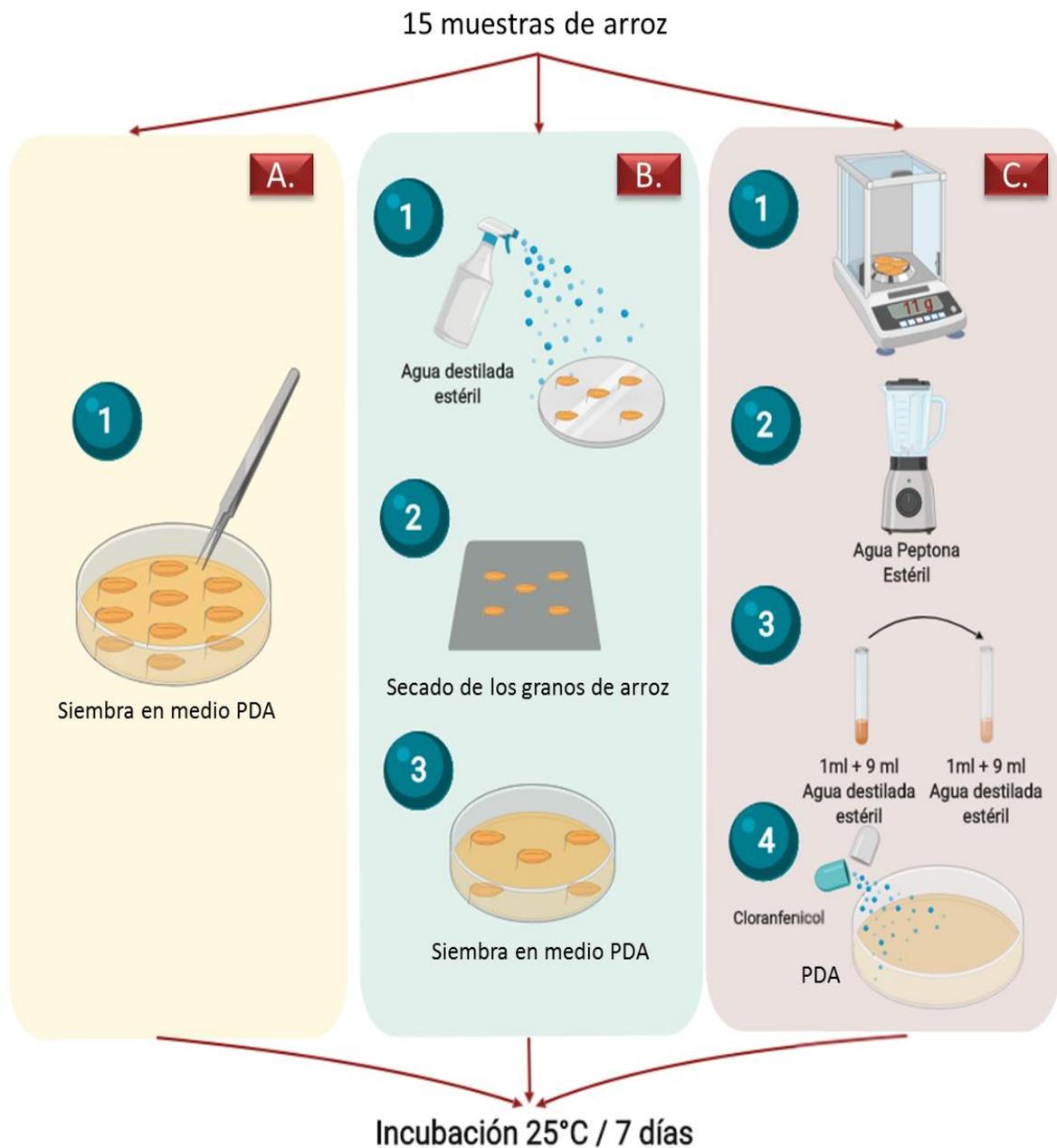


Figura 12. Metodología para el aislamiento de hongos de las muestras de arroz cultivado. A. Reconocimiento de hongos control, B. Reconocimiento de hongos de superficie del grano y C. Reconocimiento de hongos a profundidad del grano.

#### **4.3.1.1.Reconocimiento de Hongos Control**

Se tomaron 10 granos de cada muestra, los cuales fueron colocados en posición 3-4-3 en la superficie de agar PDA (Fig. 12-A).

#### **4.3.1.2.Reconocimiento de Hongos de Superficie del Grano**

Se seleccionaron 5 granos de cada muestra, dichos granos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3%, se lavaron 3 veces con agua destilada estéril, se secaron sobre papel absorbente y se ubicaron sobre el medio de cultivo PDA en posición 2-3-2 (Fig. 12-B).

#### **4.3.1.3.Reconocimiento de Hongos a profundidad del Grano**

Se tomaron 11 gramos de cada muestra, los cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 1 minuto; luego se lavaron con agua estéril y se licuaron con 99 ml de agua peptona estéril, se tomó 1 alícuota de 1 ml del licuado y se adicionó en 1 tubo de ensayo con 9 ml de agua peptona estéril, a partir del tubo anterior se realizó otra dilución. Posteriormente, se sirvió 1 ml de la última dilución en agar PDA junto con el antibiótico cloranfenicol (Fig. 12-C).

En cada una de las metodologías anteriormente descritas, las muestras procesadas se incubaron a 25°C durante 5 a 7 días.

#### **4.3.2. Identificación de Hongos**

Para la identificación de los hongos aislados se registraron características macroscópicas (Color dorsal y ventral del micelio, forma, superficie, margen y textura) y características microscópicas (Forma de conidias, hifas), éstas últimas se registraron por medio de un microscopio óptico Nikon, siguiendo las claves de Leslie y Summerell (2006), junto con las de Pitt y Hocking, (2000).

La frecuencia de aislamiento (Fr) de los hongos fueron calculados según lo planteado por González et al., (2008), mediante la fórmula:

$$Fr (\%) = \left( \frac{N^{\circ} \text{ de muestras con la especie fúngica}}{N^{\circ} \text{ de muestras totales}} \right) \times 100$$

#### 4.4. Detección y Cuantificación del Deoxinivalenol

Para la extracción de DON, se licuaron 25 gramos de cada muestra de arroz cultivado con 100 ml de una mezcla de acetonitrilo: agua (84 :16), posteriormente el extracto se purificó utilizando una columna de limpieza Micotox® M2005. El extracto purificado se llevó a sequedad, disuelto en fase móvil y finalmente se inyectó en el HPLC. El análisis cromatográfico se realizó en una columna cromatográfica de fase reversa (RP18) con detección espectrofotométrica (detector UV a 220 nm) según el cromatograma estándar de DON (Fig. 13) y aplicando la Norma Técnica Colombiana NTC 5961 (2012-12-12).

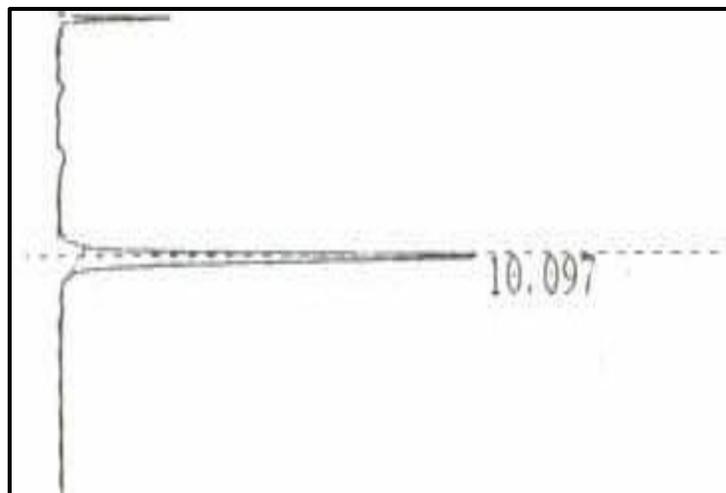


Figura 13. Cromatograma de un estándar de Deoxinivalenol.

#### **4.5. Liofilización de DON**

Se realizó la liofilización del estándar Micotox deoxinivalenol-HPLC en metanol (HPLC-DON-4). En resumen, se realizó la diálisis en buffer Tris a 25 mM de la micotoxina DON durante 24 horas, posteriormente, el contenido se traspasó a un tubo Falcon y se congeló durante 4 horas, finalmente se realizó el proceso de liofilización por 24 horas.

#### **4.6. Cultivo Celular**

La línea celular HepG2 se cultivó en medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino, hasta obtener una confluencia del 80%. Posteriormente, las células HepG2 se disociaron con tripsina al 0,25%, se sembraron en placas de 96 pozos, con una densidad de 20,000 células/100 µl por pozo y se dejaron en reposo durante 24 horas para la adhesión celular. Luego se adicionó la micotoxina liofilizada en un rango de concentración de 0, 10, 25, 50, 75 µM.

#### **4.7. Ensayo de Citotoxicidad**

El efecto de DON sobre la viabilidad celular se determinó usando el ensayo MTT. Después de 48 y 72 horas de tratamiento con DON, se evaluó la viabilidad celular adicionando 100 µl de MTT (0,5 mg/ml) e incubando por 4 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% de humedad, luego las placas se lavaron con PBS; posteriormente, se adicionó 100 µl de isopropanol ácido para solubilizar los cristales de formazan durante 1 hora en agitación suave. Finalmente, se examinó la densidad óptica a 492 nm de la solución solubilizada mediante el espectrofotómetro Teca Spectra Classic (Kupcsik, 2011).

El efecto de los complejos sobre las células HepG2 se expresó como valores del porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula (Jaimes et al., 2016):

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ 1 - \left( \frac{\text{Absorbancia media de células tratadas}}{\text{Absorbancia media del control}} \right) \right] \times 100$$

#### 4.7.1. Cálculo de la concentración inhibitoria $CI_{50}$

La concentración inhibitoria, es la concentración de la micotoxina necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular ( $CI_{50}$ ). La  $CI_{50}$  se evaluó mediante el cálculo de las curvas de inhibición del porcentaje-concentración. Se seleccionó el modelo no lineal hiperbólico para el ajuste de los datos. El análisis de regresión no lineal que se implementó, permitió la obtención de los estimadores del modelo mediante mínimos cuadrados, usando como variable respuesta a la dosis inhibitoria y como variable regresora la concentración de los complejos evaluados. La selección del modelo se basó en la gran utilidad del mismo en este tipo de ensayos y por tener el más bajo AIC (Criterio de información de Akaike) (Jaimes et al., 2016).

#### 4.8. Microscopía Electrónica de Transmisión

Se sembraron  $3 \times 10^6$  células HepG2 en placas de cultivo durante 24h para permitir la adhesión celular, posteriormente, se adicionó 50  $\mu$ M de DON durante 48 horas; a continuación, la monocapa celular se disoció con tripsina al 0,25%, luego se lavó la suspensión celular con PBS y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El pellet celular se fijó por un período de 1 a 2 horas en una mezcla 3:3 (glutaraldehido-formaldehido al 3 % en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3) (Palacios y Mendoza, 1972). Después la suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. El pellet se lavó con tampón cacodilato

y se postfijó por 3 a 12 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% preparado en el mismo tampón cacodilato. Concluido este tiempo, el pellet se lavó con solución tampón y se deshidrató en concentraciones ascendentes de alcohol etílico seguido de óxido de propileno, posteriormente, el pellet celular se infiltró con resina epoxídica a concentraciones ascendentes y finalmente, se incluyó en resina epoxídica. Del pellet de células incluidas se realizaron secciones de 1 micra de espesor, las cuales fueron coloreadas con p-fenilendiamina en solución acuosa al 1% (p/v) y secciones ultra finas de 90 nanómetros de espesor, que fueron contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo para el análisis ultraestructural (Watson, 1958; Reynolds, 1965). Por microscopía electrónica se analizaron los cambios morfológicos propios de la apoptosis en las células HepG2.

#### **4.9. Extracción de Células Polimorfonucleares**

Se tomaron por venopunción 20 ml de sangre periférica de 5 personas al azar, la sangre se mezcló con 3 ml de dextrans al 6% y se dejó en posición vertical a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, se extrajo el sobrenadante libre de glóbulos rojos y se adicionó sobre ficoll en una proporción 3:1, luego se centrifugó a 1.800 rpm por 30 minutos en un rotor basculante sin freno. El pellet de células polimorfonucleares se lavó 3 veces con medio RPMI a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C, previo a cada lavado se realizó una lisis osmótica (H<sub>2</sub>O estéril) por 30 minutos.

#### **4.10. Apoptosis por Citometría de Flujo**

Las células polimorfonucleares (PMN) ( $2 \times 10^6$  cel/ml), fueron expuestas a 29,6  $\mu$ M DON durante 2 horas. Después del tratamiento con DON, las células se lavaron con RPMI y posteriormente se resuspendieron en 500  $\mu$ l de buffer de unión con 3  $\mu$ l de Annexin-V-FITC

y 5  $\mu$ l de PI, y finalmente se incubaron a temperatura ambiente por 30 min, luego de 2 lavados con PBS. La suspensión celular fue analizada en un citómetro de flujo FACSort mediante el programa Cell Quest.

#### **4.11. Análisis Estadístico**

El análisis de los datos recopilados sobre el efecto antiproliferativo de DON en las células HepG2, se llevó a cabo mediante el software estadístico SPSS versión 23.0. Se utilizó como herramienta estadística el análisis de varianza (ANOVA) incluido dentro del diseño de experimentos, previa verificación del cumplimiento de los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia.

Las pruebas se realizaron con un nivel de significación del 5% (0,05), teniendo que si el p-valor de las pruebas aplicadas es inferior a 0,5 entonces se determina rechazar la hipótesis estadística planteada. En este caso en particular se establece si existen o no diferencias significativas en los promedios de los experimentos de citotoxicidad a diferentes concentraciones y tiempo.

Por otro lado, para analizar la inducción de la apoptosis en las células PMN se utilizó el software estadístico InfoStat versión 2008, mediante un ANOVA. Todos los ensayos realizados se hicieron por duplicado.

## 5. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados obtenidos del análisis fúngico y de la presencia del DON en las muestras de arroz cultivado en Cúcuta y El Zulia. Así mismo, se presentan los efectos citotóxicos resultantes de la exposición de las células HepG2 a DON.

### 5.1. Presencia de Hongos Micotoxigénicos en Arroz

De las muestras de arroz analizadas, 11 de las 15 muestras (75%) estaban contaminadas por al menos un hongo. Se aislaron los hongos pertenecientes al género *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (Fig. 14), que han sido ampliamente identificados como hongos micotoxigénicos (Zain, 2011; Luo et al., 2018; Manizan et al., 2018).

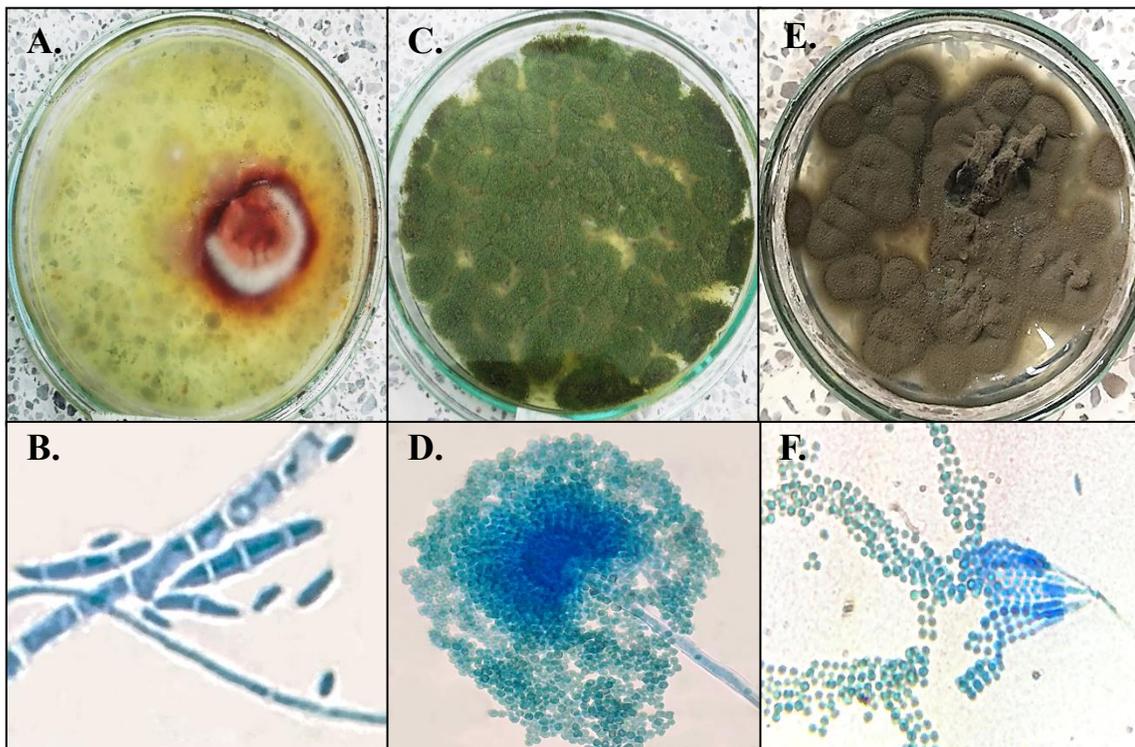


Figura 14. Características macroscópicas (A, C, E) y microscópicas 1000X (B, D, F) de los hongos aislados en las muestras de arroz. *Fusarium* spp. (A-B), *Aspergillus* spp. (C-D) y *Penicillium* spp. (E-F).

El género *Fusarium* spp., fue el que mayor frecuencia de aislamiento presentó (91%), seguido de *Aspergillus* spp. (72%), y *Penicillium* spp. (27%), como se evidencia en la Tabla 5.

Tabla 5.  
*Hongos toxigénicos asociados al arroz.*

Hongo	C. Macroscópicas	C. Microscópicas	Frecuencia de aislamiento (%)
<i>Fusarium</i> spp.	Haz: Micelio de color Rojo en la base y Blanco en el centro. Textura algodonosa.  Revés: Color Rojo difuso.	Macroconidia: corta a mediana, recta a ligeramente curvada, relativamente delgada y de pared delgada, generalmente con 3 septos. Célula apical: cónica y curva, a veces con un ligero gancho. Células basales: forma de pie a puntiagudo. Microconidia: Oval, elíptica o con forma de riñón.	91  (10/11)
<i>Aspergillus</i> spp.	Haz: Micelio de color verde, granuloso.  Revés: Color Verde difuso.	Conidios irrradiados fialidos uniseriados o biseriados. Vesículas maduras que contienen fialides en toda su superficie y conidios globulares a subglobosos.	72  (8/11)
<i>Penicillium</i> spp.	Haz: Micelio de color gris verdoso, granuloso.  Revés: Color negro	Estructura biverticiliada, con presencia de métulas, fiálides y conidias redondas a subredondeadas.	27%  (3/11)

En las tres metodologías, sólo *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. se hallaron, por lo que se pueden reconocer como contaminantes propios del arroz en cultivo. Por su parte, *Penicillium*

spp. sólo se aisló en la metodología 1, por lo que se asume que es un contaminante asociado al cultivo de arroz (Fig. 15). Así mismo, se evidenció que los municipios de Cúcuta y El Zulia, presentan condiciones adecuadas para el crecimiento de hongos toxigénicos, incluyendo *Fusarium* spp., que está relacionado con la producción de DON en el arroz cultivado; sin embargo, en las muestras del municipio de Cúcuta, se observó una mayor incidencia de aislamiento en comparación con el municipio de El Zulia (Fig. 15).

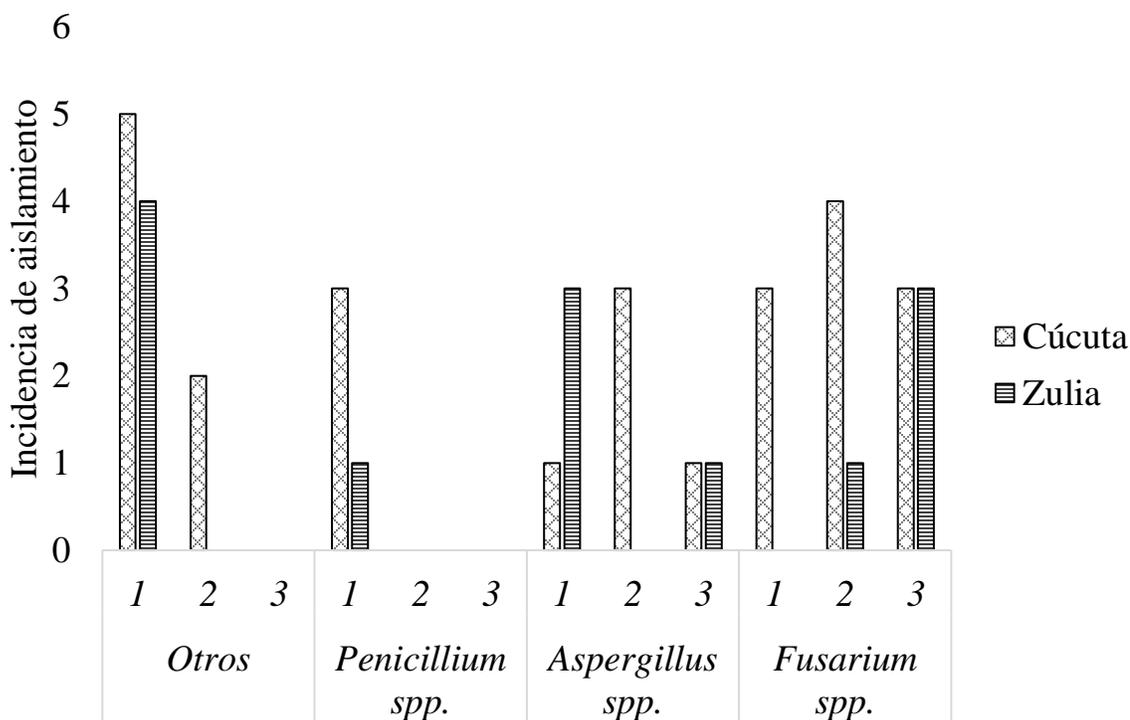


Figura 15. Incidencia de hongos en muestras de arroz cultivado por metodología y municipio.

## 5.2. Detección de DON en el Arroz Cultivado

De las 15 muestras de arroz cultivado estudiadas, ninguna presentó valores detectables por HPLC (Tabla 6). Estos resultados se deben a que, en teoría, la producción de micotoxinas se ve fuertemente influenciada por factores físicos como la humedad relativa, temperatura y actividad del agua ( $A_w$ ) (Bryden, 2012; Ferre, 2016). Así, la producción óptima de DON

ocurre a una temperatura de 28-30 °C, Aw de 0.995 y una humedad relativa del 88% (Moss, 1991; Milani, 2013; Patriarca et al., 2017; Serrano y Cardona, 2015). Aunque la temperatura media de las muestras analizadas está dentro del rango de producción del DON, los parámetros de Aw (0.555) y humedad relativa (77%), presentaron valores inferiores a los óptimos, lo que supondría la falta de producción de esta micotoxina. Lo anterior, permite confirmar que la presencia de hongos en plantas o alimentos no es necesariamente un indicador de la presencia de micotoxinas, por otro lado, la ausencia de hongos visibles tampoco descarta la presencia de micotoxinas (Terzi et al., 2014).

*Tabla 6.*

*Detección del DON en las muestras de arroz en cultivo por HPLC.*

<b>CÓDIGO MUESTRAS</b>	<b>ÁREA</b>	<b>[µg/Kg]</b>	<b>D</b>	<b>N.D.</b>
MC001	0	0.00	-	X
MC002	0	0.00	-	X
MC003	0	0.00	-	X
MC004	0	0.00	-	X
MC005	0	0.00	-	X
MC006	0	0.00	-	X
MC007	0	0.00	-	X
MC008	0	0.00	-	X
MC009	0	0.00	-	X
MC010	0	0.00	-	X
MC011	0	0.00	-	X
MC012	0	0.00	-	X
MC013	0	0.00	-	X
MC014	0	0.00	-	X
MC015	0	0.00	-	X

**D:** Detectable  
**ND:** No detectable

### 5.3. Toxicidad del DON Sobre la Línea Celular HepG2

Los efectos citotóxicos de DON sobre la proliferación de las células HepG2, se evidencian por el porcentaje de inhibición. En efecto, el porcentaje de inhibición sobre las células HepG2, en rango de concentración de DON de 10 $\mu$ M - 75 $\mu$ M fue de 24,63% $\pm$  5,6; 32,17% $\pm$ 2,7; 52,32% $\pm$ 5,4; 66,61% $\pm$ 0 a las 48h y de 25,99% $\pm$ 0,9; 45,53% $\pm$ 5; 60,795% $\pm$ ;4,7; 76,27% $\pm$ 4,3 a las 72 horas, respectivamente. Se puede evidenciar que a mayor concentración de DON (75  $\mu$ M) mayor es el porcentaje de inhibición en las células HepG2 (66,61% $\pm$ 0 y 76,27% $\pm$ 4,3) a las 48 y 72 h, respectivamente (Fig. 16), lo que indica que la exposición de DON genera un efecto antiproliferativo en las células HepG2 y disminuye su actividad metabólica para la formación de cristales de formazán.

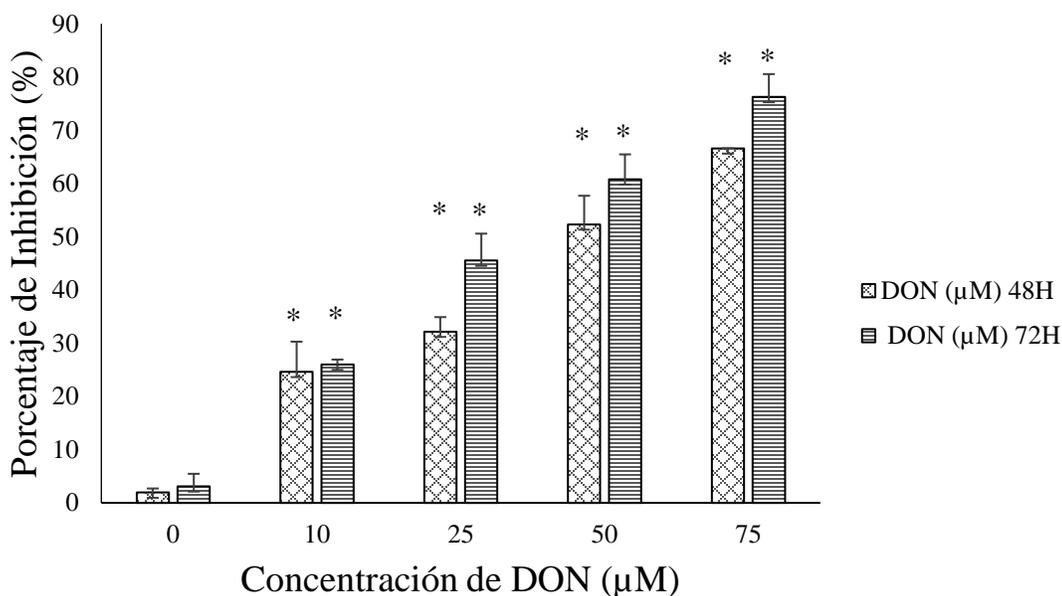


Figura 16. Citotoxicidad del DON sobre las células HepG2. Todos los valores son expresados con la media  $\pm$  SD. \*= P<0.05.

Así mismo, a mayor tiempo de exposición a la micotoxina DON (72h), mayor es el efecto de la concentración (75  $\mu$ M) en el porcentaje de inhibición de las células HepG2 (76,21% $\pm$ 4,3), comparado con el porcentaje de inhibición a las 48h (66,61%) (Fig. 17). Los

resultados indican que el DON ejerce un efecto citotóxico significativo dependiente de la concentración ( $p < 0,05$ ), a partir la concentración mínima ensayada ( $10 \mu\text{M}$ ). Además, el efecto citotóxico significativo dependiente del tiempo ( $p < 0,05$ ) a partir de una concentración de  $25 \mu\text{M}$ .

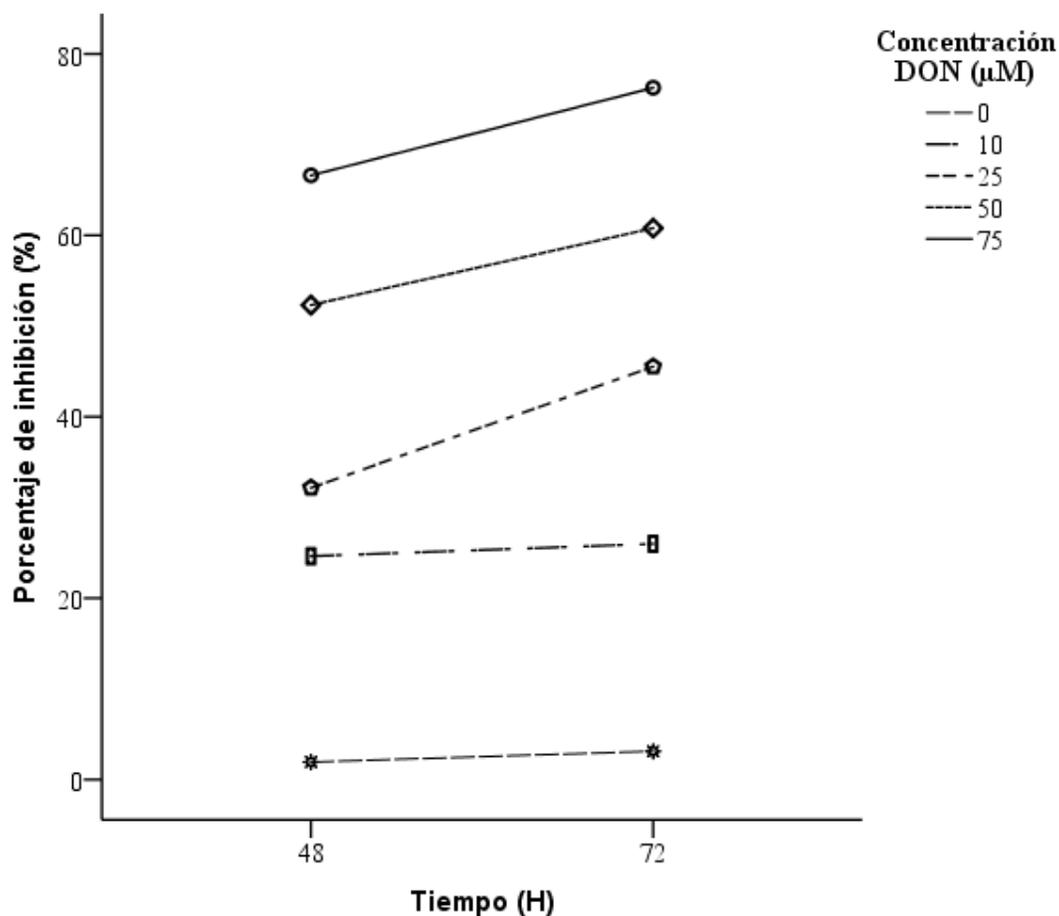


Figura 17. Citotoxicidad del DON dependiente al tiempo y concentración.  $p < 0,005$ .

La concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ) obtenida después de las 48h y 72h del tratamiento celular con DON, fue de  $42,82 \mu\text{M} \pm 1,2$  y  $29,6 \mu\text{M} \pm 4,8$ , evidenciando que la inhibición del 50% del porcentaje celular, requiere una concentración menor del DON ( $29,6 \mu\text{M} \pm 4,8$ ) a

mayor tiempo de exposición (72h), lo que confirma que el efecto citotóxico del DON sobre las células HepG2 es significativamente dependiente del tiempo ( $p < 0.05$ ) (Figura 18).

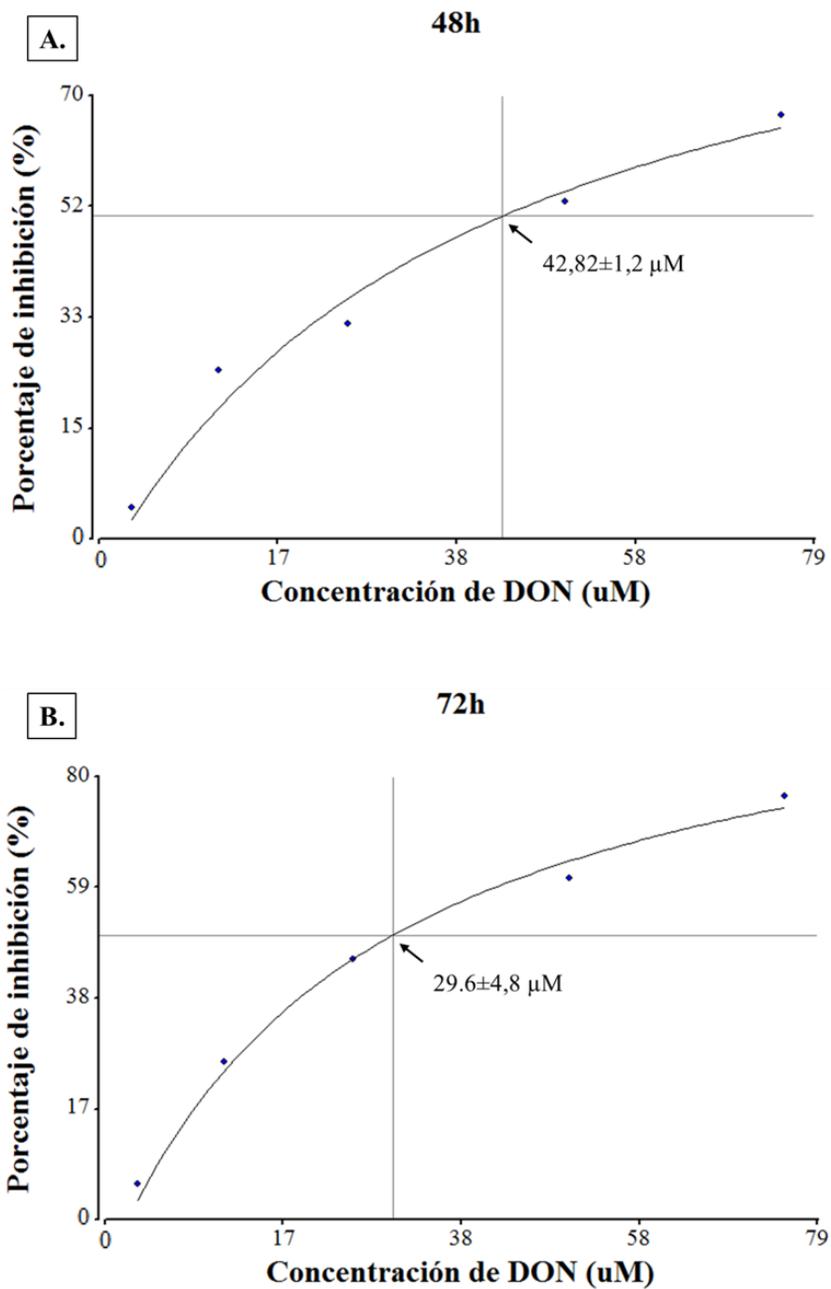
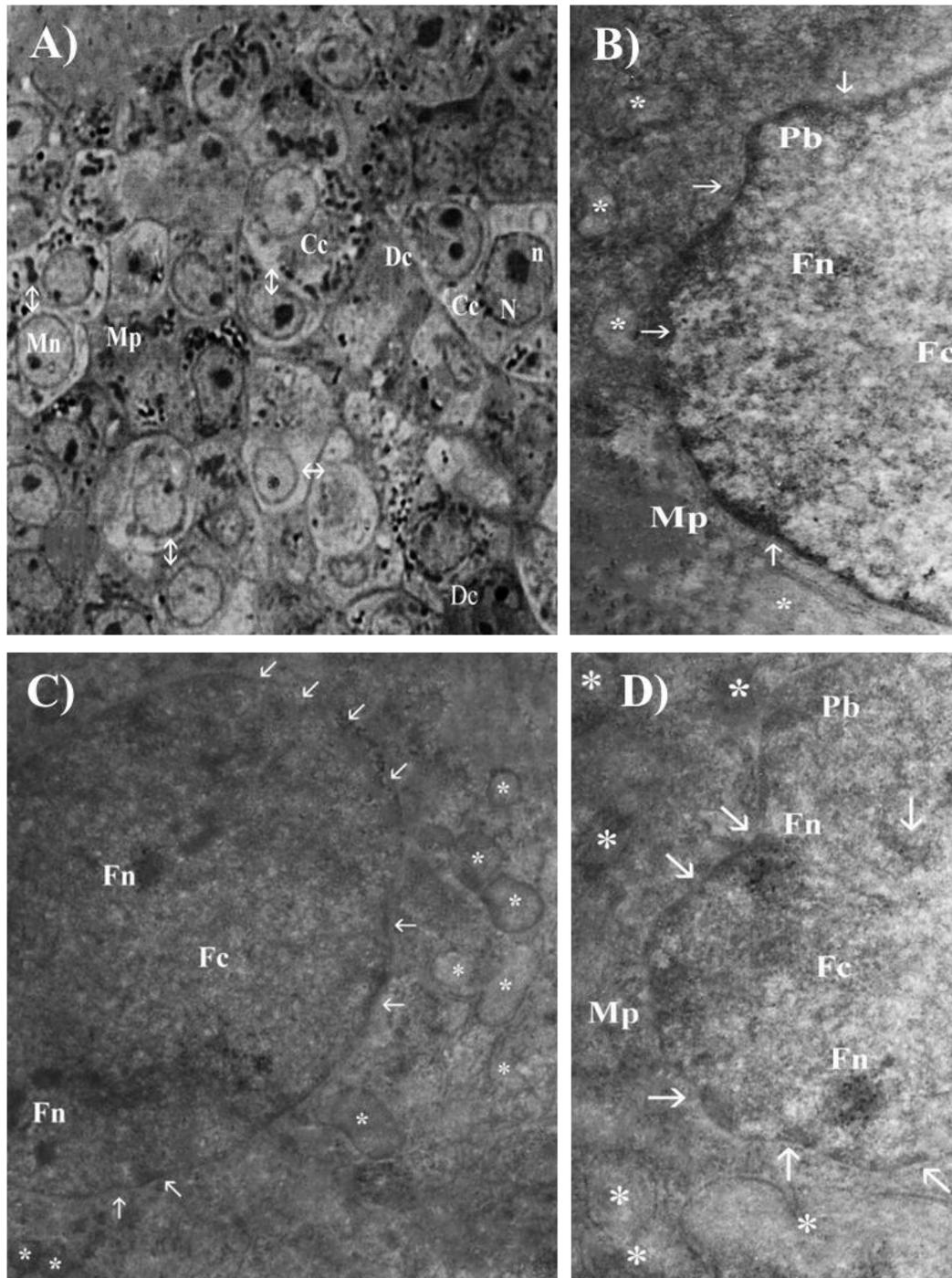


Figura 18. CI<sub>50</sub> del DON en las células HepG2 a 48h (A) y 72h (B).

#### **5.4. Cambios Morfológicos y Apoptosis de las Células HepG2 por DON**

Los cambios morfológicos de las células HepG2 por el DON, fueron determinados por medio de microscopía electrónica de transmisión. El tratamiento con 50 $\mu$ M de DON por 48 h indujo cambios sobre la morfología de las células HepG2. En el grupo control, el núcleo mantuvo su forma redondeada con presencia de un nucléolo definido; la membrana nuclear y plasmática permanecieron intactas; se observó un contenido celular y una morfología epitelial conservada, así como, alteraciones de la morfología celular y por tanto pérdida de los contactos célula a célula (Fig. 19: A). Por otro lado, las células con el tratamiento de DON, presentaron fragmentación del contenido celular y nuclear, formación de protuberancias en la membrana plasmática, cuerpos apoptóticos, así como la pérdida del contacto célula a célula (Fig. 19: B-D.), características propias de células en apoptosis.



*Figura 19.* Microscopía electrónica de Transmisión de las células HepG2, expuestas a 50  $\mu$ M DON. A. Control negativo, B.-D. células expuestas a 50  $\mu$ M de DON. Aumento: A:4.000X B-D: 6.500X. Mn= Membrana nuclear, Mp= Membrana Plasmática, Cc= Contenido celular, Dc= División celular, N= Núcleo, n= Nucléolo, Pb= Protuberancia, Fn= Fragmentación nuclear, Fc= Fragmentación celular, \* = Cuerpos apoptóticos, →= Invaginaciones de la membrana plasmática, Flecha con doble punta= Contacto célula a célula.

### 5.5. Apoptosis inducida por DON en Células Polimorfonucleares

Después del tratamiento con  $29,6 \mu\text{M}$  de DON, las células polimorfonucleares presentaron características bioquímicas de la apoptosis (Fig. 20). El porcentaje de células en apoptosis temprana ( $2,34\% \pm 0,4$  a  $7,38\% \pm 0$ ) fue menor en comparación con las células en apoptosis tardía ( $10,44\% \pm 0,5$  a  $48,32\% \pm 2,2$ ).

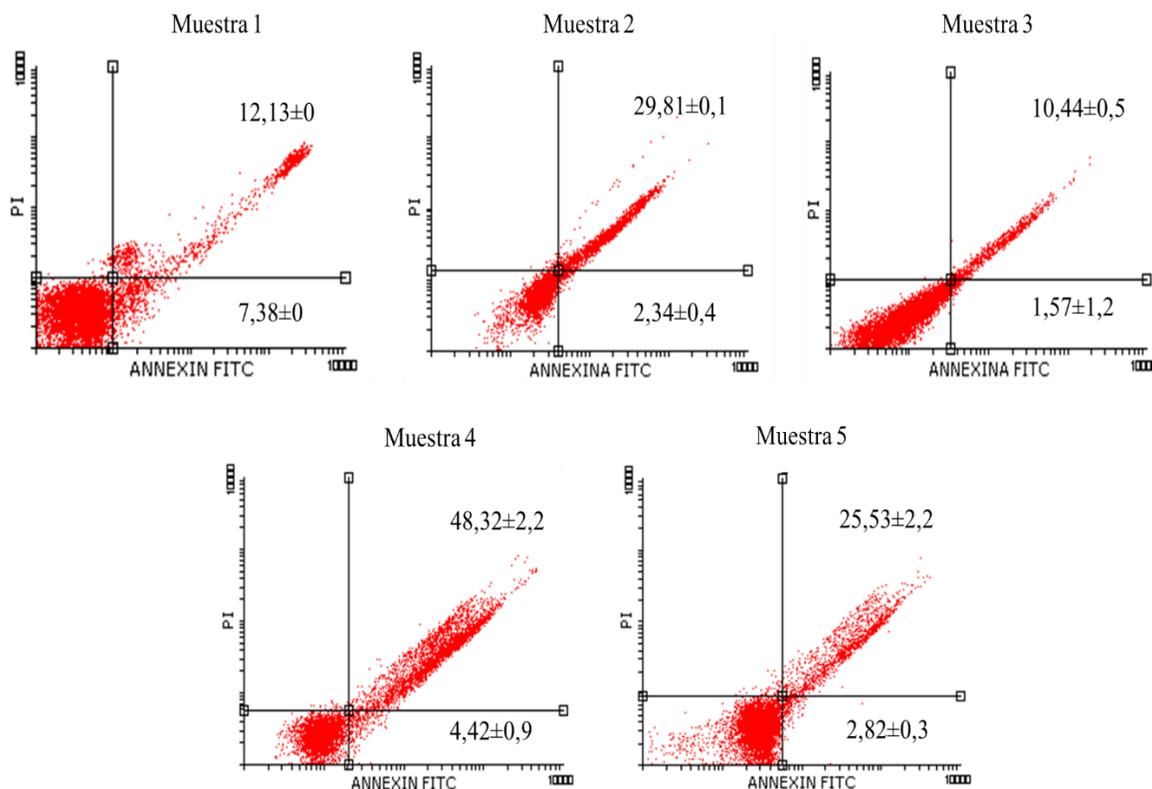


Figura 20. Potencial apoptótico de DON sobre células polimorfonucleares humanas por medio de los marcadores AnexinaV/FiTC y IP.

Además, el porcentaje total de células en apoptosis varió entre las muestras analizadas (M1:  $19,51\% \pm 0$ ; M2:  $32,15\% \pm 0,6$ ; M3:  $12,01\% \pm 1,8$ ; M4:  $52,74\% \pm 1,3$ ; M5:  $28,35\% \pm 12,8$ ) (Fig. 20); lo que permitió agruparlas en 3 subgrupos con diferencias significativas entre sí

( $P < 0,005$ ) (Fig. 21). Lo anterior supone que, a pesar de tratarse del mismo tipo celular, la inducción de la apoptosis del DON varía entre individuos.

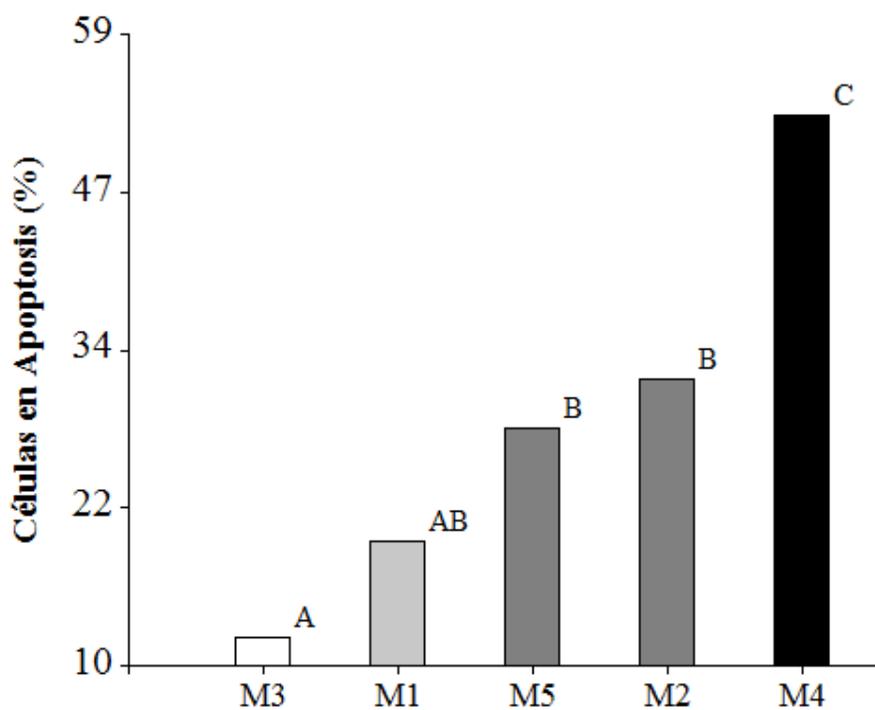


Figura 21. Agrupación de las muestras según el número de células polimorfonucleares en estado apoptótico inducido por DON.

## 6. DISCUSIÓN

Debido a la naturaleza ubicua de los hongos toxigénicos, los reportes de cereales contaminados se han extendido alrededor del mundo (Pereira et al., 2014), resultando en el aumento de la exposición humana a micotoxinas. Este estudio proporciona el primer registro de hongos toxigénicos en muestras de arroz en cultivo de Norte de Santander. Además, se logró evidenciar una alta contaminación por hongos en las muestras de arroz analizadas (75%), lo que concuerda con lo obtenido por Huong et al., (2016), quien reporta una contaminación del 96.4% de las muestras de arroz analizadas. Los hongos aislados del género *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., coinciden con el único reporte de hongos asociados al arroz para Colombia en el departamento del Meta (Castaño, 1998) y con lo de otros países (Makun et al., 2007; Lapmak et al., 2009; Makun et al., 2011; Kushiro, 2015).

*Fusarium* spp. fue el hongo micotoxigénico con mayor incidencia (91%), seguido de *Aspergillus* spp. (72%). Ok et al., (2014) y Savi et al., (2018), también reportan a *Fusarium* spp. como el género predominante en muestras de arroz colectadas en el sur de Corea y en Brasil, respectivamente. En contraste, *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp., fueron los géneros predominantes de muestras de arroz colectadas en Nigeria (Abdus et al., 2016; Makun 2011) y China (Zhao et al., 2019) y en derivados del arroz (Lv et al., 2012). Dicha discrepancia, se basa en la etapa de arroz colectado, puesto que el género *Fusarium* spp., ha sido ampliamente reconocido como un contaminante de campo, mientras que *Aspergillus* spp. como contaminante de la etapa de almacenamiento (Patriarca y Fernández, 2017). La alta incidencia de *Aspergillus* spp. en muestras de arroz en cultivo, puede ser posiblemente por altos niveles de esporas en el suelo, en residuos de plantas o en insectos que entren en contacto con éste cereal (Makun et al., 2011). Las muestras procedentes del municipio de Cúcuta, fueron las que mayor contaminación de hongos presentaron, en especial del género

*Fusarium* spp., dado a las condiciones climáticas favorables que presenta, tales como la temperatura (27°C) y la humedad (77%) (Serrano y Cardona, 2015; Ferre, 2016).

A pesar de la alta frecuencia de *Fusarium* spp., no se presentó una concentración detectable del DON en las muestras de arroz analizadas; lo que coincide con lo reportado por Kirini et al. (2015), quienes no detectaron DON en las 17 muestras de arroz y sus derivados estudiados; y por Savi et al., (2018), quienes no encontraron a DON en 100 muestras de arroz del sur de Brasil. Por otro lado, varios autores reportan la presencia de DON en arroz, pero con un porcentaje de contaminación inferior al 10% de las muestras analizadas (Almeida et al., 2012; Díaz et al., 2015; Ok et al., 2014; Ortiz et al., 2013). Así, en un estudio realizado por Almeida et al. (2012) en el arroz recolectado de regiones brasileñas, se observó que, de 230 muestras, la concentración de DON fue indetectable ( $<30 \mu\text{g} / \text{kg}$ ) en 91% de las muestras de arroz, en 96% de salvado de arroz, en 95% de salvado de cáscara de arroz y en el 100% de las muestras de arroz quebrado; cabe señalar que, aunque su incidencia es baja, la concentración en la que se presenta puede ser considerablemente alta (Ok et al., 2018).

Las toxinas de *Fusarium* son extremadamente tóxicas para las células que se dividen rápidamente, y causan hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, citotoxicidad, inmunotoxicidad y toxicidad reproductiva (Zhang et al., 2018).

Después de la ingestión de alimentos contaminados, el DON se distribuye a través de la circulación sanguínea en todo el cuerpo (Deng et al., 2016) y, gracias a sus características anfipáticas y lipófilas, se puede absorber fácilmente y atravesar las barreras biológicas, la mucosa pulmonar y el intestino, y así llegar a diferentes tejidos del cuerpo afectando las funciones y la viabilidad de las células que forman dichos sistemas (Huang, 2019; Maresca, 2013; Escrivá, 2015).

El hígado es el órgano más importante en la ruta metabólica del DON y es responsable de su detoxificación. Estudios previos han demostrado que la ingesta de alimentos contaminados con DON provoca cambios histopatológicos en el hígado porcino y afecta varios parámetros metabólicos básicos en células de hígado de rata y en hepatocitos primarios humanos (Nielsen, 2009). Numerosos estudios sobre los daños hepáticos inducidos por el DON, en diferentes modelos animales y líneas celulares, demostraron datos contradictorios, por lo que, es necesario realizar más investigaciones para tratar de esclarecer estos fenómenos biológicos (Wu et al., 2014; Peng et al., 2016).

Los resultados de citotoxicidad, revelaron una disminución significativa de la viabilidad de las células HepG2 expuestas a la concentración más baja de DON ( $10\mu\text{M}$ ) del  $24,63\% \pm 5,6$ ; no obstante, Nielsen et al. (2009) y Mayer (2017), observaron la disminución del 25% de las células HepG2 por  $1\mu\text{M}$  de DON, lo que sugiere una sensibilidad menor de las células ensayadas en este estudio al DON, cuyo resultado se le puede atribuir al proceso de liofilización realizado a la micotoxina antes de su exposición a las células HepG2, pues no se reporta en otros artículos. La concentración inhibitoria ( $\text{CI}_{50}$ ) obtenida de  $42,82 \pm 1,2\mu\text{M}$ , coincide con lo reportado por Konigs et al, (2007) en la línea celular HepG2 a 48 h ( $41,4 \pm 3,7\mu\text{M}$ ) mediante el ensayo citotóxico de conteo celular por el kit-8 (CCK-8), y difiere de lo obtenido por Mikami et al., (2004) y Cetin et al., (2005) de  $28\mu\text{M}$  a las 48 h de exposición mediante el ensayo CCK-8 y MTT, respectivamente. En cuanto al tiempo de exposición de 72 h, los resultados de  $\text{CI}_{50}$  obtenidos de  $29,6 \pm 4,8\mu\text{M}$ , concuerdan con los valores de  $\text{CI}_{50}$  de  $25\mu\text{M}$  reportados por Kouadio et al., (2005), mediante el ensayo MTT. En contraste, los valores de  $\text{CI}_{50}$  obtenidos por Fernández et al., (2018) y Juan et al., (2018) a 72 h fueron de  $2,53 \pm 0,21\mu\text{M}$  y de  $4,30 \pm 0,36\mu\text{M}$  por medio del ensayo MTT y Rojo Neutro,

respectivamente. Sin embargo, aunque las concentraciones del  $CI_{50}$  difieran entre autores, debido a las diferentes condiciones evaluadas, como finalidad del estudio, tipo de células, tiempo de exposición, rango de concentración y ensayo citotóxico utilizado, varios autores reportan un efecto de DON en la línea celular HepG2 dependiente de la concentración y el tiempo (Konigs et al., 2008; Nielsen et al., 2009; Sahu 2010; Ran et al., 2013b; Liu et al., 2016; Juan-garcía, 2017; Fernández et al., 2018). La prueba MTT es una medida del metabolismo mitocondrial de las células y éstos resultados sugieren que esta función se ve afectada en las células HepG2 por la exposición a DON.

Las mitocondrias son muy sensibles al estrés oxidativo. Las especies de oxígeno (ROS) pueden atacar a las mitocondrias e inducir una disfunción mitocondrial, lo que resulta en la apoptosis y en la disminución de la viabilidad celular (Guo et al., 2013; Yu et al., 2018). Kouadio et al., (2005), reportó que, a una concentración  $\geq 10 \mu\text{M}$ , DON afecta el metabolismo mitocondrial de las células Caco2 a través de la actividad de la succinato deshidrogenasa, a la vez que aumentaba la peroxidación lipídica, un marcador de estrés oxidativo. Zhang et al., (2009), demostró que en las células HepG2, a una concentración entre  $3.75\text{--}15 \mu\text{M}$  de DON incrementan significativamente los niveles intracelulares de ROS y producen daño en el DNA. Así mismo, Dinu et al., (2011), mostraron que la exposición de las células Hek-293 a concentraciones  $>7.5 \mu\text{M}$  de DON, reducen significativamente la viabilidad celular, disminuyen los niveles de NADH e incrementan los ROS, lo que pudo estar relacionado con una disfunción mitocondrial representada por los resultados del ensayo MTT.

Se han demostrado otros parámetros involucrados en la generación de estrés oxidativo inducido por la exposición de DON en la línea celular HepG2, incluyendo el aumento significativo del nivel de ROS, cambio del estado oxidativo, aumento de los niveles de malondialdehído (MDA) y 8-OHdG (8-hidroxideoxiguanosina), y la acumulación de aniones

superóxido, lo que, a su vez, podrían afectar la integridad de la membrana celular y alterar el metabolismo celular normal (Braicu et al. 2009; Bodea et al. 2009; Dragomir et al., 2009; Zhang et al., 2009; Sugiyama et al. 2012; Mishra et al., 2014; Payros et al., 2016; Juan et al., 2017; Yu et al., 2018).

En éste estudio, la hipótesis de que la exposición de las células HepG2 al DON induce apoptosis se aceptó por los cambios morfológicos evidenciados mediante microscopía electrónica, que incluyeron fragmentación del contenido celular y nuclear, invaginaciones de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos, así como alteraciones de la morfología celular y por tanto pérdida de los contactos célula a célula (Fig. 16: B-D). Dichos resultados coinciden con los reportados por Lei et al., (2017), en donde presentan que las células epiteliales de tejido hepático humano (L-02) tratadas con DON, mostraron cambios morfológicos típicos de las células apoptóticas, con la aparición de núcleos de forma irregular y cromatina fragmentada, acompañado del aumento del estrés oxidativo con la generación de ROS y la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Mikami et al., (2010), indujeron lesiones apoptóticas en tejidos hepáticos de cerdos por la exposición a DON, revelando una condensación de la cromatina y cuerpos apoptóticos. Por su parte, Ma et al., (2012), comprobaron que la exposición a DON sobre las células HT-29 provoca la fragmentación nuclear y la presencia de cuerpos apoptóticos. Minervini et al., (2004), expusieron las células de eritroleucemia (K562) a una concentración de DON de 80  $\mu$ M, encontrando signos de apoptosis tardía, incluyendo condensación del citoplasma, encogimiento celular, cambio de forma celular, la condensación de la cromatina nuclear y la fragmentación nuclear. Lo que permite suponer que la citotoxicidad del DON en las células HepG2, se caracteriza por la muerte celular apoptótica.

Los resultados de la citometría de flujo demostraron que las células polimorfonucleares son susceptibles durante 2h de exposición a 29,6  $\mu\text{M}$  de DON, quien induce apoptosis hasta en el 52,74% $\pm$ 1,3 de estas células, de las cuales entre un 2,34% $\pm$ 0,4 a 7,38% $\pm$ 0 estaban en apoptosis temprana y entre un 10,44% $\pm$ 0,5 a 48,32% $\pm$ 2,2 en apoptosis tardía. Los datos reportados por Casteel et al., (2010), fueron similares para la apoptosis temprana del 4.4% al 9.1%, pero difieren de los de apoptosis tardía al 11% en las células HepG2 expuestas a 5 $\mu\text{M}$  de DON por 12 horas. En contraste, Wentzel et al., (2016), obtuvieron que después de la exposición a 15  $\mu\text{M}$  de DON durante 24h, las células que estaban en apoptosis temprana era mayor (39,5% $\pm$  3,9) a las que estaban en apoptosis tardía (10,9% $\pm$ 2,7). Por su parte, Deng et al., 2016, determinaron que la exposición a 250, 500 y 1000 ng/mL de DON sobre las células HUVECs, no inducía una apoptosis significativa (0,1 a 0,9%). Así mismo, Li et al., (2014b), sólo encontraron una tasa significativa de apoptosis (13,7%) en células DF-1 en la concentración más alta ensayada (2000 ng/ml) durante 24 h. En otro estudio, Yang et al., (2014) reportaron que los niveles de Annexina V positiva en linfocitos de sangre periférica humana, fueron significativos de una manera dependiente de la dosis de 6.25 a 50 ng / mL después de 6, 12 y 24 h de tratamiento con DON. Por lo anterior, se deduce que la inducción de la apoptosis de DON se ve afectada por el tipo de célula, la concentración y tiempo de exposición.

Por otro lado, el porcentaje total de células apoptóticas presentó diferencias en las 5 muestras analizadas, pese a ser el mismo tipo de población celular, lo que concuerda con la premisa de que dentro de una especie determinada, el impacto de las micotoxinas en la salud está influenciado por la edad, sexo, peso, dieta, exposición a agentes infecciosos y por la

presencia de otras micotoxinas (efecto sinérgico) y/o sustancias farmacológicamente activas (Zain, 2011).

## 7. CONCLUSIONES

El arroz cultivado en los municipios de Cúcuta y El Zulia presenta condiciones óptimas para el crecimiento y contaminación de hongos toxigénicos del género *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp., siendo *Fusarium* spp. el hongo que mayor frecuencia de aislamiento presentó con un 91%, quién puede generar varios metabolitos altamente tóxicos, incluyendo el DON.

La ausencia de concentraciones de DON en el arroz cultivado en Cúcuta y El Zulia, permite suponer que éste no presenta las condiciones fisicoquímicas, ni variables meteorológicas óptimas para la producción de esta micotoxina. Sin embargo, dado la presencia de varios hongos toxigénicos, no se puede descartar la posibilidad de una futura producción de DON u otro tipo de micotoxinas como contaminantes del arroz cultivado en estos municipios, que supondría graves riesgos en la salud humana.

El DON, es un agente citotóxico en las células HepG2 que genera una disfunción mitocondrial y altera la actividad metabólica celular, con un marcado efecto antiproliferativo significativo de manera dependiente a la concentración a partir de la concentración mínima ensayada (10  $\mu$ M) y dependiente al tiempo de exposición desde valores superiores a 25  $\mu$ M.

La exposición de DON en las células HepG2, induce cambios morfológicos como la fragmentación del contenido celular y nuclear, invaginaciones de la membrana plasmática y la formación de cuerpos apoptóticos, así como alteraciones de la morfología celular generando la pérdida del contacto célula a célula, características de una muerte celular apoptótica. Lo anterior, puede suponer que la alteración metabólica generada por DON, activa mecanismos celulares, posiblemente, mediante la vía mitocondrial, que desencadenan la apoptosis.

Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que las células polimorfonucleares son susceptibles a la inducción de la apoptosis por DON, ya que evidenciaron alteraciones bioquímicas propias de la apoptosis temprana, como la externalización de la fosfatidilserina y de la apoptosis tardía, como la fragmentación del ADN, en un rango de  $2.34\% \pm 0,4$  a  $7,38\% \pm 0$  y de  $10,44\% \pm 0,5$  a  $48,32\% \pm 2,2$  de la población celular, respectivamente.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdus-Salaam, R., Atanda, O., Fanelli, F., Sulyok, M., Cozzi, G., Bavaro, S., et al. (2016). Fungal isolates and metabolites in locally processed rice from five agro-ecological zones of Nigeria. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 9, 281–289.
- Acuña, C., Díaz, G., y Espitia, M. (2005). Aflatoxiinas en maíz: reporte de caso en la Costa Atlántica colombiana. *Rev. Med. Vet. Zoot.*, Vol. 52, p. 156 – 162.
- Adejumo, T., y Adejoro, D. (2014). Incidence of aflatoxins, fumonisins, trichothecenes and ochratoxins in Nigerian foods and possible intervention strategies. *Food Science and Quality Management*, 31, 127–146.
- Adeyeye, S. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2: 1213127. Adeyeye, *Cogent Food & Agriculture* (2016), 2: 1213127 <http://dx.doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>
- AFSSA (Agence française de sécurité sanitaire des aliments). (2006). Risk assessment for mycotoxins in human and animal food chains. Retrieved from <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP-Ra-MycotoxinesEN.pdf>.
- Ahmad, B., Ashiq, S., Hussain, A., Bashir, S. y Hussain, M. (2014). Evaluation of mycotoxins, mycobiota, and toxigenic fungi in selected medicinal plants of Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *fungus biology* Vol. 118, p. 776-784.
- Alassane-Kpembi, I., Kolf-Clauw, M., Gauthier, T., Abrami, R., Abiola, F.A., Oswald, I.P., (2013). New insights into mycotoxin mixtures: the toxicity of low doses of Type B trichothecenes on intestinal epithelial cells is synergistic. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 191–198.

- Alcaldía Municipal del Zulia. (2018). Nuestro municipio. Actualizado el 16 de mayo de 2018. Recuperado en internet de: <http://www.elzulia-nortedesantander.gov.co/municipio/nuestro-municipio>
- Alexander, N., Proctor, R., McCormick, S. (2009). Genes, gene clusters, and biosynthesis of trichothecenes and fumonisins in *Fusarium*. *Toxin Reviews*, Vol. 28(2-3), p. 198–215.
- Almeida, M., Almeida, N., Carvalho, K., Gonçalves, G., Silva, C., Santos, E., Garcia, C., Vargas, E. (2012). Co-occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, and citreoviridin in rice in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*. Vol. 29:4, p. 694-703.
- Amagliani, L., O’regan, J., Kelly, A., y O’Mahony. J. (2017). Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients. *Journal of Food Composition and Analysis*. Vol. 59; p. 18–26.
- Anfossi, L., Giovannoli, C., Baggiani, C. (2016). Mycotoxin detection. *Current Opinion in Biotechnology*. Vol. 37 p. 120–126.
- Arunachalam, C., y Doohan F. (2013). Trichothecene toxicity in eukaryotes: Cellular and molecular mechanisms in plants and animals *Toxicology Letters*, Vol. 217 P. 149–158
- Ashiq, S., Hussain, M. y Ahmad, B. (2014). Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. *Fungal Genet. Biol.* Vol. 66, p. 1-10.
- Bae, H., Gray, J., Li, M., Vines, L., Kim, J., Pestka, J., (2010). Hematopoietic cell kinase associates with the 40S ribosomal subunit and mediates the ribotoxic stress response to deoxynivalenol in mononuclear phagocytes. *Toxicological Sciences* Vol. 115, Pag. 444–452.

- Benbrook, D., y Long, A. (2012). Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp.Oncol.* Vol. 34, Pag. 286–297.
- Bensassi, F., Bennour, E.E.O., Essefi, S.A., Bouaziz, C., Hajlaoui, M.R., Bacha, H., (2009). Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells. *Toxicol.* 264, 104–109.
- Bensassi, F., Gallerne, C., El Dein, O., Lemaire, C., Hajlaoui, M., Bacha, H. (2012). Involvement of mitochondria-mediated apoptosis in deoxynivalenol cytotoxicity. *Food and Chemical Toxicology.* Vol. 50, P. 1680–1689.
- Berridge, M., Herst, P., Tan, A. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. In: El-Gewely MR (ed) *Biotechnology annual review*, vol 11. Elsevier, p 127–152.
- Bethke, N., Conard, C., Fosdick, L., Fox, E., Grunig, D., Kirkvold, S., Ladhe, A., Leland, J., Lewis, J., Peters, E. (2014). Method and apparatus for reducing aflatoxin–contaminated corn. US Patent Publication No. 8919569 B2.
- Bhullar, N., y Gruissem, W. (2013). Nutritional enhancement of rice for human health: The contribution of biotechnology. *Biotechnology Advances.* Vol. 31(1), p. 50–57.
- Bin-Umer, M., McLaughlin, J., Butterly, M., McCormick, S., Tumer, N. (2014). Elimination of damaged mitochondria through mitophagy reduces mitochondrial oxidative stress and increases tolerance to trichothecenes. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 111, p. 11798-11803.
- Bodea, G., Munteanu, M., Dinu, D., Serban, A., Roming, F., Costache, M., Dinischiotu, A., (2009). Influence of deoxynivalenol on the oxidative status of HepG2 cells. *Romanian Biotechnol. Lett.* Vol. 14, p. 4349–4359.

- Bony, S., Carcelen, M., Olivier, L., Devaux, A., (2006). Genotoxicity assessment of deoxynivalenol in the Caco-2 cell line model using the comet assay. *Toxicol. Lett.* Vol. 166, p. 67–76.
- Braicu, C., Berindan-Neagoe, I., Tudoran, O., Balacescu, O., Rugina, D., Gherman, C., Socaciu, C., Irimie, Al., 2009. In vitro evaluation of the chemoprotective action of flavan-3-ols against deoxynivalenol related toxicity. *Arch. Zootechn.* Vol. 3, p. 45–55.
- Brase, S., Encinas, A., Keck, J., Nising, C. (2009). Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem. Rev.* Vol. 109, p. 3903–4399.
- Broom, L. (2015). Mycotoxins and the intestine. *Animal Nutrition.* Vol. 1, p. 262-265.
- Bryden, W. (2009). Mycotoxins and mycotoxicoses: Significance, occurrence and mitigation in the food chain.
- Bryden, W. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology.* Vol. 173, p.134– 158.
- Cano, G., González-Arias C.A., Ramos A.J., Sanchis V., Fernández-Cruz, M.L. (2015). Cytotoxicity of the mycotoxins deoxynivalenol and ochratoxin A on Caco-2 cell line in presence of resveratrol. *Toxicology in Vitro.* Vol. 29, p. 1639–1646.
- Cargnello, M., y Roux, P. (2011). Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Vol. 75, No. 1, p. 50–83.
- Castaño, J. (1998). Etiología del manchado de grano en arroz de secano en Colombia e Indonesia. *Fitopatología.* Vol. 12.

- Casteel, M., Nielsen, C., Kothlow, S., Dietrich, R., & Märtlbauer, E. (2010). Impact of DUSP1 on the apoptotic potential of deoxynivalenol in the epithelial cell line HepG2. *Toxicology Letters*, Vol. 199(1), p. 43–50.
- Castilla, Y., Mercado, I., Mendoza, V., Monroy, M. (2011). Determinación y cuantificación de los niveles de aflatoxinas en bollos de mazorca producidos en Arjona (Departamento de Bolívar- Colombia). *AVANCES Investigación en ingeniería*. Vol. 8(1), p. 71-6.
- Cetin, Y., y Bullerman, L. (2005). Cytotoxicity of Fusarium mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Bullerman. Food and Chemical Toxicology*. Vol. 43, p. 755–764.
- Champagne, E., Wood, D., Juliano, B., y Bechtel, D. (2004). The rice grain and its gross composition, In: Champagne, E.T. (Ed.), *Rice: Chemistry and Technology*. 3rd ed. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, pp. 77–107.
- Channaiah, L., & Maier, D. E. (2014). Best stored maize management practices for the prevention of mycotoxin contamination. *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*, p. 78–88. doi: 10.1002/9781118832790.ch6
- Chaudari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., d’Hellencourt, C., Ramanan, P. (2014). A molecular web: endoplasmic reticulum stress, inflammation, and oxidative stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol. 8. doi:10.3389/fncel.2014.00213
- Cheng, Y, y Yang, J. (2011). Survival and death of endoplasmic-reticulum-stressed cells: role of autophagy. *WorldJ Biol Chem*. Vol. 2, p. 226–231.
- Chicagui, J., y Echeverría, E. (2015). Estado de la investigación a nivel mundial sobre la micotoxina deoxinivalenol (DON) durante los últimos cinco años (2010-2015). UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS. Bogotá.

- Choi, J., Lee, S., Nah, J., Kim, H., Paek, Ji., Lee, S., Ham., Hong, S., et al. (2018). Species composition of and fumonisin production by the *Fusarium fujikuroi* species complex isolated from Korean cereals. *International Journal of Food Microbiology*. Vol 267, p. 62–69.
- Cole, R., Scheweikert, M., Jarvis, B. (2003). *Handbook of Secondary Fungal Metabolites*, Vols. I–III. Academic Press, CA, USA
- Comi, G., e Iacumin, L. (2013). Ecology of moulds during the pre-ripening and ripening of San Daniele dry cured ham. *Food Research Int*. Vol. 54, p. 1113-1119.
- Commission of the European Communities, (2006). Commission recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding. *Off. J. Eur. Union L* Vol. 229, p. 7–9.
- Costa S, Schwaiger S, Cervellati R, Stuppner H, Speroni E, Guerra MC. (2009). In vitro evaluation of the chemoprotective action mechanisms of leontopodic acid against aflatoxin B1 and deoxynivalenol-induced cell damage. *J Appl Toxicol*. Vol. 29, p. 7-14.
- Costantini, S., Di Bernardo, G., Cammarota, M., Castello, G., Colonna, G. (2013). Gene expression signature of human HepG2 cell line. *Gene*, Vol. 518(2), p. 335–345.
- Cuevas, A. (2012). El clima y el cultivo del arroz en Norte de Santander. *Revista Arroz*. Vol. 60 (497), p. 4-8.
- DANE – FEDEARROZ. (2017). 4° Censo Nacional Arrocerero Año 2016. Actualizado el 10 de febrero de 2017. Recuperado el 14 de septiembre del 2018. Véase en internet: <http://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuaria/censo-nacional-arrocerero/boletin-tecnico-4to-censo-nacional-arrocerero-2016.pdf>

- DANE. (2017). Encuesta Nacional Agropecuaria ENA-2016. Actualizado el 4 de agosto de 2017. Recuperado el 14 de septiembre del 2018. Véase en internet: [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2016/boletin\\_ena\\_2016.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/enda/ena/2016/boletin_ena_2016.pdf)
- Das, A., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2011). Cereal based functional food of Indian subcontinent: A review. *Journal of Food Science and Technology*. Vol. 49, p. 665–672.
- De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I. y De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. Vol. 766, p. 32-41.
- Del Ponte, E., Garda-Buffon, J., Badiale-Furlong, E. (2012). Deoxynivalenol and nivalenol in commercial wheat grain related to Fusarium head blight epidemics in southern Brazil. *Food Chemistry*. Vol. 132, p. 1087–1091.
- Deng, C., Ji, C., Qin, W., Cao, X., Zhong, J., Li, Y., Srinivas, S., Feng, Y., Deng, X. (2016). Deoxynivalenol inhibits proliferation and induces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol.43, P. 232–241.
- Díaz, G., Krska, R., y Sulyok, M. (2015). Mycotoxins and cyanogenic glycosides in staple foods of three indigenous people of the Colombian Amazon. *Food Additives & Contaminants: Part B*, DOI: 10.1080/19393210.2015.1089948
- Díaz, G., Perilla, N., & Rojas, Y. (2001). Occurrence of aflatoxins in selected colombian foods. *Mycotoxin Research*, 17(1), 15–20.
- Díaz, G., y Céspedes, A. (1997). Natural occurrence of zeralenone in feeds and feedstuffs used in poultry and pig nutrition in colombia. *Mycotoxin Research*, Vol. 13(2), p. 81–87.

- Dinu, D., Bodea, G., Ceapa, C., Munteanu, M., Roming, F., Serban, A., Hermenean A., Costache, M., Zarnescu, O., y Dinischiotu, A. (2011). Adapted response of the antioxidant defense system to oxidative stress induced by deoxynivalenol in Hek-293 cells. *Toxicon*, Vol. 57, p. 1023–1032.
- Döll, S., y Dänicke, S. (2011). The Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) in animal feeding. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 102, P. 132– 145.
- Donato, M., Tolosa, L., y Gómez. M. (2014). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, p. 77–93. doi:10.1007/978-1-4939-2074-7\_5
- Dragomir, B., Munteanu, M., Dinu, D., Serban, A., Roming, F., Costache, M., Dinischiotu, A., (2009). Influence of deoxynivalenol on the oxidative status of HepG2 cells. *Rom. Biotech. Lett.* Vol. 14, p. 4349–4359.
- Eckhardt, J., Santurio, J., Zanette, R., Rosa, A., Scher, A., Dal Pozzo, M., Alves, S., Ferreiro, L. (2014). Efficacy of a Brazilian calcium montmorillonite against toxic effects of dietary aflatoxins on broilers reared to market weight. *Br. Poult. Sci.* Vol. 55, p. 215–220.
- Edwards, S. G., Dickin, E. T., MacDonald, S., Buttler, D., Hazel, C. M., Patel, S., et al. (2011). Distribution of Fusarium mycotoxins in UK wheat mill fractions. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 28, p. 1694-1704.
- EFSA. (2004). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to deoxynivalenol (DON) as undesirable substance in animal feed. *EFSA J.* 73, 1–41, Available <http://www.efsa.eu.int/>.
- EFSA. (2013). Deoxynivalenol in food and feed: Occurrence and exposure, *EFSA Journal*, Vol. 11 (10), 3379.

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, Vol. 35(4), p. 495–516.
- Eriksen, G. (2003). Metabolism and toxicity of trichothecenes. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Science. Disponible en: <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000287/01/Thesis.pdf>.
- Escrivá, L., Font, G., Manyes, L., (2015). In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 78, P. 185-206.
- European Commission (EC), (2017). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Document including amendments until August 2017. Disponible en: <https://tinyurl.com/yd23m3q6>.
- Fang, H., Zhi, Y., Yu, Z., Lynch, R., y XudongJia. (2018). The embryonic toxicity evaluation of Deoxynivalenol (DON) by murine embryonic stem cell test and human embryonic stem cell test models. *Food Control*. Vol. 86, p. 234-240.
- FAO. (2003). Reglamentos a nivel mundial para las micotoxinas en los alimentos y en las raciones en el año 2003. Véase en internet: <http://www.fao.org/3/a-y5499s.pdf>
- FAO. (2004). El arroz en el mundo: Colombia. Disponible en: <http://www.fao.org/rice2004/es/p3.htm>.
- FAO. (2016). FAOSTAT. Online available: <http://www.fao.org/faostat/en/#compare> (Acceso 18 agosto 2017).
- FAO. (2017). Rice Market Monitor. Online available: <http://www.fao.org/economic/RMM> (Acceso 20 December 2017).

- FAO. (2017b). Seguimiento del mercado del arroz de la FAO. FAO vol. XX, Ed No 1. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM\\_MARKETS\\_MONITORING/Rice/Images/RMM/SMA\\_APR17.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Rice/Images/RMM/SMA_APR17.pdf)
- Favero, G., Woelflingseder, L., Braun, D., Puntischer, H., Kütt, M.-L., Dellafiora, L., Marko, D. (2018). Response of intestinal HT-29 cells to the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol and its sulfated conjugates. *Toxicology Letters*, Vol. 295, p. 424–437.
- Fedearroz. (2017). Consumo de Arroz en Colombia. Recuperado el 15 de septiembre del 2018. Véase en internet: <http://www.fedearroz.com.co/new/consumo.php>
- Fernández, C., Elmo, L., Waldner, T., & Ruiz, M.-J. (2018). Cytotoxic effects induced by patulin, deoxynivalenol and toxin T2 individually and in combination in hepatic cells (HepG2). *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 120, p. 12–23.
- Ferre, F. (2016). Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food Control* 62, 291-298.
- Flusberg, D., y Sorger, P. (2015). Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells, *Trends Cell Biol*, Vol. 25, p. 446-458.
- Foroud, N., y Eudes, F. (2009). Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 10(1), p. 147–173.
- García, D., Ramos, A., Sanchis, V. y Marin, S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: A review. *Food Microbiology*. Vol. 26, p. 757–769.
- Gimeno, A., Martins, M. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos*. 3 edición.
- González, M., Pereyra, C., Ramirez, M., Rosa, C., Dalcero, A., Cavaglieri, L. (2008). Determination of mycobiota and mycotoxins in pig feed in central Argentina. *Letters in applied microbiology*, Vol.46, p. 555-561.

- Gordeziani, M., Adamia, G., Khatisashvili, G., & Gigolashvili, G. (2017). Programmed cell self-liquidation (apoptosis). *Annals of Agrarian Science*, Vol. 15(1), p. 148–154.
- Gouze, M., Laffitte, J., Rouimi, P., Loiseau, N., Oswald, I., Galtier, P., (2005). Effect of various doses of deoxynivalenol on liver xenobiotic metabolizing enzymes in mice. *Food Chem. Toxicol.* Vol. 27, p. 585–590.
- Green, D., y Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, Vol. 305, p. 626-629.
- Grilo, A. L., & Mantalaris, A. (2019). Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnology Advances*. Vol. 37(3), p. 459-475.
- Grove, J., (2007). The trichothecenes and their biosynthesis. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* Vol. 88, p. 63–130.
- Guo, C., Sun, L., Chen, X., Zhang, D. (2013). Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. *Neural Regen Res*. Vol. 8(21), p. 2003–2014.
- He, T., Zhou, T., Young, C., Boland, G., y Scott, P. (2010). Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. *trends in Food Science & Technology*. Vol. 21, p. 67-76.
- Hirst, J. y Stedman, O. (1967). Long-distance spore transport: methods of measurement, vertical spore profiles and the detection of immigrant spores. *Journal of general microbiology*, Vol. 48(3), p. 329–55.
- Hoffmeister, D., y Keller, N. (2007). Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat Prod Rep*. Vol. 24, p. 393–416. doi:10.1039/b603084j.
- Hou, Y., Zhao, Y., Xiong, B., Cui, X., Kim, N., Xu, Y., Sun, S. (2013) Mycotoxin-containing diet causes oxidative stress in the mouse. *PLoS One* Vol. 8(3) e60374

- Hove, M., De Boevre, M., Lachat, C., Jacxsens, L., Nyanga, L.K., De Saeger S. (2016). Occurrence and risk assessment of mycotoxins in subsistence farmed maize from Zimbabwe. *Food Control* Vol. 69, p. 36-44.
- Huang, D., Cui, L., Dai, M., Wang, X., Wu, Q., Hussain, H.I., Yuan, Z., (2019b). Mitochondrion: a new molecular target and potential treatment strategies against trichothecenes, *Trends in Food Science & Technology*, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.03.004>.
- Huang, D., Cui, L., Sajid, A., Zainab, F., Wu, Q., Wang, X., & Yuan, Z. (2019a). The epigenetic mechanisms in *Fusarium* mycotoxins induced toxicities. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 123, p. 595-601.
- Huis in't Veld, J.H.J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int. J. Food Microbiol.* 33, 1–18.
- Hundie, G., Woldemeskel, D., Gessesse, A. (2016). Evaluation of Direct Colorimetric MTT Assay for Rapid Detection of Rifampicin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*. Vol 12(2).
- Huong, B., Tuyen, L., Do, T., Madsen, H., Brimer, L., Dalsgaard, A. (2016). Aflatoxins and fumonisins in rice and maize staple cereals in Northern Vietnam and dietary exposure in different ethnic groups. *Food Control*. Vol. 70, p. 191-200.
- IARC. (2002). International agency for research on cancer iarc monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. Lyon: IARC Press, pp. 1–601.
- IDEAM. (S.f). Características climatológicas de ciudades principales y municipios turísticos. Resupero en internet de:

<http://www.ideam.gov.co/documents/21021/21789/1Sitios+turisticos2.pdf/cd4106e9-d608-4c29-91cc-16bee9151ddd>

INS. (2015). Evaluación de riesgo de carcinoma hepatocelular en población colombiana por consumo de arepa de maíz contaminada con aflatoxina B1 (AFB1). Recuperado de internet:

<https://www.ins.gov.co/Direcciones/Vigilancia/Publicaciones%20ERIA%20y%20Plaguicidas/ER%20AFB1.pdf>

Iqbal, S., Nisar, S., Asi, M., Jinap, S. (2014). Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control*. Vol. 43, p. 98-103.

Islam, M.R., Roh, Y.S., Kim, J., Lim, C.W., Kim, B. (2013). Differential immune modulation by deoxynivalenol (vomitoxin) in mice. *Toxicol. Lett.* Vol. 221, p. 152-163.

Jaimes, N., Salmen, S., Colmenares, M., Burgos, A., Tamayo, L., Mendoza, V., Cantor, A. (2016). Efecto citotóxico de los compuestos de inclusión de paladio (II) en la beta-ciclodextrina. *Biomédica*. vol.36, n.4, p.603-611.

JECFA. (2011). Evaluation of certain contaminants in food. Seventy-second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No 959.

Jedidi, I., Soldevilla, C., Lahouar, A., Marín, P., González-Jaén, M., Said, S. (2018). Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi Journal of Biological Sciences*. Vol. 25, p. 868-874

Juan, A., Berrada, H., Font, G., & Ruiz, M.-J. (2017). Evaluation of acute toxicity and genotoxicity of DON, 3-ADON and 15-ADON in HepG2 cells. *Toxicology Letters*, Vol. 280, S266. doi:10.1016/j.toxlet.2017.07.942

- Juan, A., Taroncher, M., Font, G., Ruiz, Marí.-José (2018)., Micronucleus induction and cell cycle alterations produced by deoxynivalenol and its acetylated derivatives in individual and combined exposure on HepG2 cells, *Food and Chemical Toxicology* Volume 118, August, Pages 719-725
- Kang, R., Li, R., Dai, P., Li, Z., Li, Y., Li, C. (2019). Deoxynivalenol induced apoptosis and inflammation of IPEC-J2 cells by promoting ROS production. *Environmental Pollution*. Vol. 251, p. 689-698.
- Katika, M.R., Hendriksen, P.J., van Loveren, H., P A, A.C.M., (2015). Characterization of the modes of action of deoxynivalenol (DON) in the human Jurkat T-cell line. *J. Immunotoxicol*. Vol. 12, p 206–216.
- Katika, M.R., Hendriksen, P.J.M., Shao, J., van Loveren, H., Peijnenburg, A., (2012). Transcriptome analysis of the human T lymphocyte cell line Jurkat and human peripheral blood mononuclear cells exposed to deoxynivalenol (DON): new mechanistic insights. *Toxicol. Appl. Pharm.* Vol. 264, p. 51–64.
- Keller, N., Turner, G., y Bennett, J. (2005). Fungal secondary metabolism — from biochemistry to genomics. *Nature Reviews Microbiology* Vol. 3, p. 937–947.
- Kharayat, B., y Singh, Y. (2018). Mycotoxins in Foods: Mycotoxicoses, Detection, and Management. *Microbial Contamination and Food Degradation*  
<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00013-5>
- Kim, H. S., and Lee, M. S. (2007). STAT1 as a key modulator of cell death. *Cell. Signal*. Vol. 19, p. 454–465.
- Kimura, M., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Ohsato, S., Fujimura, M. (2007). Molecular and Genetic Studies of *Fusarium* Trichothecene Biosynthesis: Pathways, Genes, and Evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(9), 2105–2123.

- Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*. Vol.198(1-3) p. 315-28.
- Kondratskyi, A., Kondratska, K., Skryma, R., & Prevarskaya, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Vol. 1848(10), p. 2532–2546.
- Königs, M., Lenczyk, M., Schwerdt, G., Holzinger, H., Gekle, N., Humpf, H.U. (2007). Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture. *Toxicology*. Vol. 240, p. 48–59.
- Königs, M., Schwerdt, Gekle N., Humpf, H.U. (2008). Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes. *Mol. Nutr. Food Res*. Vol. 52, p. 830–839.
- Kouadio, J.H., Dano, S.D., Moukha, S., Mobio, T.A., Creppy, E.E. (2007). Effects of combinations of *Fusarium* mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. *Toxicon* Vol. 49, p. 306–317.
- Kouadio, J.H., Mobio, T.A., Baudrimont, I., Moukha, S., Dano, S.D., Creppy, E.E. (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology* Vol. 213, p. 56–65.
- Kovalsky, P., Kos, G., Nahrer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., Sulyok, M., Krska, R. (2016). Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins

- andsecondary metabolites in finished feed and maize-an extensive survey. *Toxins* Vol. 8, 363.
- Krajarng, A., Imoto, M., Tashiro, E., Fujimaki, T., Shinjo, S., Watanapokasin, R., (2015). Apoptosis induction associated with the ER stress response through up-regulation of JNK in HeLa cells by gambogic acid. *BMC Comple. Alter. Med.* Vol. 15, p. 26-34
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol. Rev.* Vol. 87 (1), p. 99–163.
- Kupcsik, L. (2011). Estimation of Cell Number Based on Metabolic Activity: The MTT Reduction Assay. *Mammalian Cell Viability*, 13–19. doi:10.1007/978-1-61779-108-6\_3
- Kushiro, M. (2015). Historical review of researches on yellow rice and mycotoxigenic fungi adherent to rice in Japan. *JSM Mycotoxins.* Vol. 65, p. 19 – 23.
- Laitila, A. (2015). Toxigenic fungi and mycotoxins in the barley-to-beer chain. *Brewing Microbiology.* <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00006-X>
- Lapmak, K., Lumyong, S., Wangspa, R. and Sardsud, U. (2009). Diversity of filamentous fungi on brown rice from Pattalung Province, Thailand. *Journal of Agricultural Technology* Vol. 5 (1), p. 129-142.
- Lei, Y., Guanghui, Z., Xi, W., Yingting, W., Xialu, L., Fangfang, Y., ... Lammi, M. J. (2017). Cellular responses to T-2 toxin and/or deoxynivalenol that induce cartilage damage are not specific to chondrocytes. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-02568-5
- Leslie, J., y Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual.* Blacwell. Iowa USA. 388 p.

- Li, D., Ma, H., Ye, Y., Ji, C., Tang, X., Ouyang, D., Chen, J., Li, Y., Ma, Y. (2014a). Deoxynivalenol induces apoptosis in mouse thymic epithelial cells through mitochondria-mediated pathway. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* Vol. 38, p. 163–171.
- Li, D., Ye, Y., Lin, S., Deng, L., Fan, X., Zhang, Y., Deng, X., Li, Y., Yan, H., Ma, Y. (2014b). Evaluation of deoxynivalenol-induced toxic effects on DF-1 cells in vitro: Cell-cycle arrest, oxidative stress, and apoptosis. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* Vol. 37, p. 141-149.
- Liao, Y., Peng, Z., Chen, L., Nüssler, A., Liu, L. (2018). Deoxynivalenol, gut microbiota and immunotoxicity: A potential approach? *Food and Chemical Toxicology.* Vol. 112, p. 342–354.
- Lin, J., Walter, P., y Yen, B. (2008). Endoplasmic Reticulum Stress in Disease Pathogenesis. *Annu Rev Pathol.* Vol. 3, P. 399–425.
- Liu R, Jin Q, Huang J, Liu Y, Wang X, Zhou X. Mao W, Wang S. (2011) In vitro toxicity of aflatoxin B (1) and its photodegradation products in HepG2 cells. *J Appl Toxicol.* Vol. 32(4), p. 276-81.
- Liu, Y., Lu, Y., Wang, L., Chang, F., Yang, L. (2016). Occurrence of deoxynivalenol in wheat, Hebei Province, China. *Food Chemistry.* Vol. 197, p. 1271–1274.
- Lu, J., Yu, J., Lim, S., Son, Y., Kim, D., Lee, S., Shi, X. y Lee, J. (2013). Cellular mechanisms of the cytotoxic effects of the zearalenone metabolites a-zearalenol and b-zearalenol on RAW264.7 macrophages. *En: Toxicology in Vitro*, vol.27, p 1007–1017.
- Luo, Y., Liu, X., & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins - A review. *Food Control*, Vol. 89, p. 123–132.

- Lu, X.-C., Huang, Z.-Q., Zhang, W., Rao, P.-F., & Ni, L. (2012). Identification and characterization of filamentous fungi isolated from fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing. *The Journal of General and Applied Microbiology*, Vol. 58(1), p. 33–42.
- Ma, Y., Zhang, A., Shi, Z., He, C., Ding, J., Wang, X., ... Zhang, H. (2012). A mitochondria-mediated apoptotic pathway induced by deoxynivalenol in human colon cancer cells. *Toxicology in Vitro*, Vol. 26(3), p. 414–420.
- Magan, N. (2006). Mycotoxin contamination of food in Europe: early detection and prevention strategies. *Mycopathologia*. Vol. 162, p. 245–253.
- Makun, H. A., Dutton, M. F., Njobeh, P. B., Mwanza, M., & Kabiru, A. Y. (2011). Natural multi-occurrence of mycotoxins in rice from Niger State, Nigeria. *Mycotoxin Research*, Vol. 27, p. 97-104.
- Makun, H. A., Gbodi1, T. A., Akanya1, O. H., Salako, E. A., & Ogbadu, G. H. (2007). Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza Sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 6(2), p. 99-108.
- Manda, G., Mocanu, M.A., Marin, D.E., Taranu, I. (2015). Dual effects exerted in vitro by micromolar concentrations of deoxynivalenol on undifferentiated caco-2 cells. *Toxins*. Vol. 7(2), 593-603. doi:10.3390/toxins7020593
- Manizan, A., Oplatowska-Stachowiak, M., Piro-Metayer, I., Campbell, K., Koffi-Nevry, R., Elliott, C., Akaki, D., Montet, D., Brabet, C. (2018). Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Cote d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*, Vol 87, p 22-30.
- Maresca, M., (2013). From the gut to the brain: journey and pathophysiological effects of the food-associated trichothecene mycotoxin deoxynivalenol. *Toxins* Vol. 5, p. 784–820.

- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G., Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*. 60, 218-237.
- Martínez, M. y Londoño, W. (2017). Aflatoxinas en alimentos y exposición dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Biosalud*. Vol.16. p.53-66.
- Martinez, M., Moreano, M., y Ocampo, G. (2019). Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control*. Vol. 98. P 359-366.
- Martínez, M., Taborda, G., y Rosero, M. (2015). Validation of a High Performance Liquid Chromatography Method for Aflatoxins Determination in Corn Arepas. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. Vol. 26, p. 1-7.
- Mayer, E., Novak, B., Springler, A., Schwartz-Zimmermann, H. E., Nagl, V., Reisinger, N., Schatzmayr, G. (2017). Effects of deoxynivalenol (DON) and its microbial biotransformation product deepoxy-deoxynivalenol (DOM-1) on a trout, pig, mouse, and human cell line. *Mycotoxin Research*, Vol. 33(4), p. 297–308.
- McCormick, S., Stanley, A., Stover, N., Alexander, N. (2011). Trichothecenes: From Simple to Complex Mycotoxins. *Toxins*, 3(7), 802–814.
- McGaw, L., Elgorashi, E., y Eloff, J. (2014). Cytotoxicity of African Medicinal Plants Against Normal Animal and Human Cells. En Kuete, V. (Ed). *Toxicological Survey of African Medicinal Plants*. Londres. Elsevier.
- McIlwain, D., Berger, T., Mak, T. (2015). Caspase Functions in Cell Death and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* Vol. 7, a026716. doi:10.1101/cshperspect.a026716
- Mendiola, A., y Cruz, S. (2005). Vía JAK-STAT: Una visión general. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, Vol. 8(1-2), p. 14-25.

- Menke, J., Weber, J., Broz, K. y Kistler, C. (2013). Cellular Development Associated with Induced Mycotoxin Synthesis in the Filamentous Fungus *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 8(5): p. 63-77. doi:10.1371/journal.pone.0063077
- Mikami, O., Yamaguchi, H., Murata, H., Nakajima, Y., y Miyazaki, S. (2010). Induction of apoptotic lesions in liver and lymphoid tissues and modulation of cytokine mRNA expression by acute exposure to deoxynivalenol in piglets. *Journal of Veterinary Science*, Vol. 11(2), p. 107. doi:10.4142/jvs.2010.11.2.107
- Mikami, O., Yamamoto, S., Yamanaka, N., Nakajima, Y. (2004). Porcine hepatocyte apoptosis and reduction of albumin secretion induced by deoxynivalenol. *Toxicology*, Vol. 204, p. 241-249.
- Milani, J. (2013). Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Vet Med*, Vol. 58, p. 405-411.
- Minervini, F., Fornelli, F., Flynn K. (2004). Deoxynivalenol induces apoptosis in PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Toxicology in Vitro*. Vol. 18, p. 21–28
- Ministerio de Salud y Protección social. (2013). Resolución número 004506 de 2013. Véase en internet: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/resolucion-4506-de-2013.pdf>
- Mishra, S., Dwivedi, P., Pandey, H., Das. M. (2014). Role of oxidative stress in Deoxynivalenol induced toxicity. *Food and Chemical Toxicology* Vol. 72, P. 20–29
- Moore, D., Robson, G., y Trinci, A. (2011). 21st century guidebook to fungi (1st ed.). Cambridge University Press. ISBN 978-0521186957. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9780511977022>

- Moretti, A., Susca, A., Mulé, G., Logrieco, A., y Proctor, R. (2013). Molecular biodiversity of mycotoxigenic fungi that threaten food safety. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 167, p. 57-66.
- Morris, L. (2011). Determinación de aflatoxinas en muestras de maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*) para consumo humano en cinco departamentos de la Costa Caribe Colombiana mediante cromatografía de alta eficiencia durante seis meses en 2011. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá.
- Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* Vol. 3, p. 65:55-63.
- Moss, M.O. (1991). Mycology of cereal grain and grain products. In: Chelkowski, J. (Ed.), *Cereal Grain: Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*. Elsevier Science Publishing Inc, New York, pp. 23–51.
- Muganda, P. (2015). An Overview of Apoptosis Methods in Toxicological Research: Recent Updates. Muganda, P. (Ed.). *Apoptosis Methods in Toxicology*. Humana Press. Estados Unidos.
- Muthayya, S., Sugimoto, J. D., Montgomery, S., y Maberly, G. F. (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 1324, p. 7-14.
- Nagy, C.M., Fejer, S.N., Berek, L., Molnar, J., Viskolcz, B. (2005.) Hydrogen bondings in deoxynivalenol (DON) conformations – a density functional study. *J. Mol. Struct.* Vol. 726, P. 55–59.
- Neme, K., y Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*. Vol 78; p. 412-425.

- Nesic K, Milicevic D, Nesic V, Ivanovic S. (2015). Mycotoxins as one of the foodborne risks most susceptible to climatic change. *Procedia Food Sci*, Vol. 5, p. 207-210.
- Nguyen, P., Strub, C., Fontana, A., y Schorr-Galindo S. (2017). Crop molds and mycotoxins: Alternative management using biocontrol. *Biological Control*. Vol. 104, P. 10-27.
- Nielsen C, Lippke H, Didier A, Dietrich R, Martlbauer E. (2009). Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatomacells. *Mol. Nutr. Food Res*. Vol. 53: p. 479–491.
- Nogueira, A., Keen, J., Wild, C., Findlay, J. (2011). An analysis of the phosphoproteome of immune cell lines exposed to the immunomodulatory mycotoxin deoxynivalenol. *Biochimica et Biophysica Acta* Vol. 1814. P. 850–857
- Núñez, F., Lara, M.S., Peromingo, B., Delgado, J., Sanchez-Montero, L., Andrade, M.J. (2015). Selection and evaluation of *Debaryomyces hansenii* isolates as potential bioprotective agents against toxigenic penicillia in dryfermented sausages. *Food Microbiol*. Vol. 46, p. 114-120.
- Ok, H., Kim, D., Kim, D., Chung, S., Chung, M., Park, K. (2014). Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control*, Vol. 37, p. 284-291.
- Ok, H., Lee, S., y Chun S. (2018). Occurrence and simultaneous determination of nivalenol and deoxynivalenol in rice and bran by HPLC-UV detection and immunoaffinity cleanup. *Food Control* Vol. 87, p. 53-59.
- Okeke, C., Ezekiel, C., Sulyok, M., Ogunremi, O., Ezeamagu, C., Sarkanj, B., Warth, B., y Krska, R. (2018). Traditional processing impacts mycotoxin levels and nutritional value of ogi – a maizebased complementary food. *Food Control*. Vol. 86, P. 224-233.

- Oliveira, CAF., Corassin, CH., Corrêa, B., Oswald, IP. (2014b). Animal Health: Mycotoxins. En Van Alfen (Ed.). Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. Elsevier. USA.
- Oliveira, P., Zannini, E., y Arendt, E. (2014a). Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. Food Microbiology. doi: 10.1016/j.fm.2013.06.003.
- Orrenius, S., Nicotera, P., Zhivotovsky, B. (2011). Cell death mechanisms and their implications in toxicology, Toxicol Sci, Vol. 119, p. 3-19.
- Ortiz, J., Camp, J., Mestdagh, F., Donoso, S., Meulenaer, B. (2013). Mycotoxin co-occurrence in rice, oat flakes and wheat noodles used as staple foods in Ecuador. Food Additives & Contaminants: Part A. Vol. 30:12, p. 2165-2176.
- Pacin, A., Gonzáles, H., Etcheverry, M., Resnik, S., Vivas, L., Espin, S. (2002). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. Mycopathologia, Vol. 156, p. 87-92.
- Palacios-Prü, E., Mendoza-Briceño, R. (1972). An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. Brain Res Vol. 36, p. 404-408.
- Pallepati, P., y Averill, D. (2012). Reactive Oxygen Species, Cell Death Signaling and Apoptosis, in: K. Pantopoulos, H. Schipper (Eds.) Princ Free Rad Biomed, Nova Science Publishers, Inc., Place Published, p. 513-546.
- Pan, X., Whitten, D., Wilkerson C., Pestka, J. (2013). Dynamic changes in ribosome-associated proteome and phosphoproteome during deoxynivalenol-induced translation inhibition and ribotoxic stress. Toxicol. Sci. Vol. 138, p. 217-233.
- Patriarca, A., y Fernández, V. (2017). Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. Current Opinion in Food Science. Vol, 14, p.50–60.

- Payros, D., Alassane-Kpembi, I., Pierron, A., Loiseau, N., Pinton, P., Oswald, I. (2016). Toxicology of deoxynivalenol and its acetylated and modified forms. *Archives of Toxicology*. Vol. 90, p. 2931–2957
- Payros, D., Dobrindt, U., Martin, P., Secher, T., Bracarense, A.P.F.L., Boury, M., Laffitte, J., Pinton, P., Oswald, E., Oswald, I.P. (2017). The food contaminant deoxynivalenol exacerbates the genotoxicity of gut microbiota. Vol. 8, P. 7–17.
- Peng, W., Marchal, M., y van der Poel, A. (2018). Strategies to prevent and reduce mycotoxins for compound feed manufacturing. *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 237, p. 129–153.
- Peng, Z., Chen, L., Nüssler, A.K., Liu, L., Yang, W., (2016). Current sights for mechanisms of deoxynivalenol-induced hepatotoxicity and prospective views for future scientific research: a mini review. *J. Appl. Toxicol.* Vol. 37, p. 518–529.
- Pereira, V. L., Fernandes, J. O. & Cunha, S. C. (2014). Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: A review on occurrence and recent methods of analysis. *Trends in food science and technology*, Vol. 36, p. 96–136.
- Perilla, N., & Diaz, G. (1998). Incidence and levels of fumonisin contamination in Colombian corn and corn products. *Mycotoxin Research*, Vol. 14(2), p. 74–82.
- Pestka, J. (2007) Deoxynivalenol: toxicity, mechanisms and animal health risks. *Anim Feed Sci Technol* Vol. 137, p. 283–298. doi:10.1016/j.anifeedsci.2007.06.006
- Pestka, J. (2008) Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit Contam* Vol. 25, p. 1128–1140. doi:10.1080/02652030802056626
- Pestka, J. (2010). Deoxynivalenol-induced proinflammatory gene expression: mechanisms and pathological sequelae. *Toxins (Basel)* Vol. 2, p. 1300–17

- Pestka, J. (2010). Toxicological mechanisms and potential health effects of deoxynivalenol and nivalenol. *World Mycotoxin J.* Vol. 3, P. 323–47
- Pestka, J., y Smolinski, A. (2005). Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* Vol. 8, p. 39–69.
- Pestka, J., Zhou, H., Moon, Y., Chung, Y. (2004). Cellular and molecular mechanism for immune modulation by deoxynivalenol and others trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.* Vol. 153, p. 61–73.
- Pfliegler, WP., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2015). Mycotoxins-prevention and decontamination by yeasts. *J Basic Microbiol*, Vol. 55, p. 805-818.
- Pierron A, Mimoun S, Murate LS et al (2016a) Intestinal toxicity of the masked mycotoxin deoxynivalenol-3-beta-d-glucoside. *Arch Toxicol* Vol. 90. P. 2037–2046. doi:10.1007/s00204-015-1592-8
- Pierron A, Mimoun S, Murate LS et al (2016b) Microbial biotransformation of DON: molecular basis for reduced toxicity. *Sci Rep* Vol. 6, p. 29105. doi:10.1038/srep29105
- Pinton, P. y Oswald, I. (2014). Effect of Deoxynivalenol and Other Type B Trichothecenes on the Intestine: A Review. *Toxins*, Vol. 6, P. 1615-1643.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D’Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*, Vol. 8(4), p. 603–619.
- Pitt, J.I., (2000). Toxigenic fungi and mycotoxins. *Br. Med. Bull.* 56, 184–192.
- Präbst, K., Engelhardt, H., Ringgeler, S., Hübner, H. (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. En Gilbert, D., Friedrich, O. (Ed.). *Cell Viability Assays. Methods and Protocols.* Germany. Humana Press.

- Prado, R. (2018). Revisión sobre las aflatoxinas en Avicultura. Universidad De Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A. Bogotá.
- Radko, L., Tkaczyk, A., Jedziniak, P., Trebas, S., Posyniak, A. (2018). Toxicity and metabolism of deoxynivalenol in human hepatoma (HepG2) cell line. *Toxicology Letters* Vol. 295, p. S146-S147
- Ramírez S. Determinación de la aflatoxina b1 (af21) en algunos alimentos listos para el consumo por medio de la técnica diba competitiva indirecta. *Alimentos Hoy*. Vol. 8, p. 4-8.
- Ran, R., Zhang, W., Cui, B., Xu, Y., Han, Z., Wu, A. and Shi, J. (2013). A simple and rapid method for the determination of deoxynivalenol in human cells by UPLC-TOF-MS. *Analytical Methods* Vol. 5, p. 5637-5643.
- Ray, S., Yang, N., Pandey, S., Bello, N., Gray, J. (2019). Apoptosis. Reference Module in Biomedical Sciences. doi:10.1016/b978-0-12-801238-3.62145-1
- Reddy, K., Salleh, B., Saad, B., Abbas, HK., Abel, CA., Shier, WT. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev*, Vol. 29, p. 3-26.
- Reddy, K., Saritha, P., Reddy, C., y Muralidharan, K. (2009). Aflatoxin B1 producing potential of *Aspergillus flavus* strains isolated from stored rice grains. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 8, p. 3303-3308.
- Redza, M., y Averill, D. (2016). Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Vol. 1863(12), p. 2977–2992.

- Reed, J.C., (2006). Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities. *Cell Death Differ.* Vol. 13, p. 1378–1386.
- Reynolds, E. (1965). The use of lead citrate at high pH as an electrón-opaque satín in electrón microscopy. *J Cell Biol* Vol. 17, p. 208-212.
- Rocha O., Ansari K. y Doohan F. (2005): Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review, *Food Additives and Contaminants*, Vol. 22:4, p. 369-378
- Rocha, M.E.B. da, Freire, F. da C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F., Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control* Vol. 36, p. 159–165.
- Rojas, L., y Wilches, A. (2012). C oexistencia de afl atoxinas, zearalenona y deoxinivalenol en alimentos de consumo infantil. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. Vol. 10., P. 73-79.
- Santos da Silva I., Paim A., y Silva M. (2018). Composition and estimate of daily mineral intake from samples of Brazilian rice. *Microchemical Journal* Vol. 137; p. 131–138.
- Sarroco, S., y Vannacci, G. (2018). Preharvest application of beneficial fungi as a strategy
- Savi, G. D., Piacentini, K. C., Rocha, L. O., Carnielli-Queiroz, L., Furtado, B. G., Scussel, R., ... Angioletto, E. (2018). Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 270, p 5–13.
- Schenzel, J., Hungerbuhler, K., Bucheli, T.D., (2012). Mycotoxins in the environ-ment: II. Occurrence and origin in Swiss river waters. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 46, p. 13076–13084.
- Schmeits, P., Katika, M., Peijnenburg, A., van Loveren, H., Hendriksen, P. (2014). DON shares a similar mode of action as the ribotoxic stress inducer anisomycin while

- TBTO shares ER stress patterns with the ER stress inducer thapsigargin based on comparative gene expression profiling in Jurkat T cells. *Toxicol. Lett.* Vol. 224, P. 395–406.
- Schönthal, A. (2012). Endoplasmic Reticulum Stress: Its Role in Disease and Novel Prospects for Therapy. *Scientifica*. Vol. 2012, pag. 26.
- Serrano-Coll, H. y Cardona-Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev CES Med.* Vol. 29. P. 143-152.
- Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Diff*, Vol. 22, p. 526-39.
- Sharif, M. K., Butt, M. S., Anjum, F. M., y Khan, S. H. (2014). Rice bran: A novel functional ingredient. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 54(6).
- Sherrington, S., Kumwenda, P., Kousser, C. y Hall, R. (2018). Advances in Applied Microbiology, Vol. 102, p. 159-221.
- Shi, Y., Porter, K., Parameswaran, N., Bae, H., Pestka, J. (2009). Role of GRP78/BiP Degradation and ER Stress in deoxynivalenol-induced interleukin-6 upregulation in the macrophage. *Toxicol Sci.* Vol. 110, Pag. 249–250.
- Shraim A. (2017). Rice is a potential dietary source of not only arsenic but also other toxic elements like lead and chromium. *Arabian Journal of Chemistry*. Vol. 10, p. S3434–S344.
- Singh J., Kaur L., y Ogawa Y. (2016). Importance of chemistry, nutrition and technology in rice processing. *Food Chemistry* Vol. 191; 1.
- Singh, S., Banerjee, S., Chattopadhyay, P., Borthakur, S., Veer, V. (2015). Deoxynivalenol induces cytotoxicity and genotoxicity in animal primary cell culture. *Toxicol. Mech. Methods*. Vol. 25, p. 184-191.

- Slobodchikova, I., y Vuckovic, D. (2018). Liquid Chromatography – High Resolution Mass Spectrometry Method for Monitoring of 17 Mycotoxins in Human Plasma for Exposure Studies. *Journal of Chromatography A*. Vol. 1548, p. 51-63.
- Smith MC., Madec, S., Coton, E., Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*, 8, 94; doi:10.3390/toxins8040094
- Smith, M.C., Gheux, A., Coton M., Madec, S., Hymery, N., y Coton, E. (2018). In vitro co-culture models to evaluate acute cytotoxicity of individual and combined mycotoxin exposures on Caco-2, THP-1 and HepaRG human cell lines. *Chemico-Biological Interactions* Vol. 281, P. 51-59.
- Smith, M.C., Hymery, N., Troadec, S., Pawtowski, A., Coton, E., y Madec, S. (2017). Hepatotoxicity of fusariotoxins, alone and in combination, towards the HepaRG human hepatocyte cell line. *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 109, P. 439-451
- Sobral, M., Faria, M., Cunha, S., Ferreira, I. Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells. *Chemosphere*. Vol. 202, p.538-548.
- Sobrova, P., Adam, V., Vasatkova, A., Beklova, M., Zeman, L., Kizek, R. (2010) Deoxynivalenol and its toxicity, *Interdiscip. Toxicol.* Vol. 3, P. 94–99.
- Stepanenko y Dmitrenko, V. (2015). Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene*. Vol. 574, Issue 2, P. 193-203.
- Stephanou, S., and Latchman, D. S. (2005). Opposing actions of STAT-1 and STAT-3. *Growth Factors* Vol. 23, p. 177–182.

- Stockert JC, Blázquez-Castro A, Cañete M, Horobin RW, Villanueva A. (2012). MTT. Análisis de viabilidad celular: la localización intracelular del producto de formazán se encuentra en gotitas de lípidos. *Acta Histochem.* Vol. 114, p. 785–796.
- Sugiyama, K., Kinoshita, M., Kamata, Y., Minai, Y., Tani, F., & Sugita-Konishi, Y. (2012). Thioredoxin-1 contributes to protection against DON-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Mycotoxin Research*, Vol. 28(3), p. 163–168
- Summerell, B. y Leslie, J. (2011). Fifty years of *Fusarium*: how could nine species have ever been enough? *Fungal Divers.* Vol. 50, p. 135–144.
- Sun, X., Zhang, X., Wang, H., Cao, W., Yan, X., Zuo, L., Wang, J., Wang, F., (2002). Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G1 on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Biomed. Environ. Sci.* Vol. 15, p. 145–152.
- Tala, M., y Kebede, B. (2016). Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review. *Cogent Food & Agriculture.* Vol.2.
- Tanaka, K., Sago, Y., Zheng, Y., Nakagawa, H., & Kushiro, H. (2007). Mycotoxins in rice. *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 119, p. 59-66.
- Taroncher, M., Tolosa, J., Prosperini, A., & Ruiz, M.-J. (2018). In silico and in vitro prediction of the toxicological effects of individual and combined mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology.* Vol. 122, p. 194-202.
- Taylor, R., Cullen, S., Martin, S. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* Vol. 9, p. 231–241.
- Terzi, V., Tumino, G., Stanca, M., Morcia, C. (2014). Reducing the incidence of cereal head infection and mycotoxins in small grain cereal species. *Journal of Cereal Science.* Vol. 59, p. 284-293.
- to prevent postharvest mycotoxin contamination: A review. *Crop Protection.*

- Tolosa, L., Donato, M., y Gómez-Lechón, J. (2015). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. En Vinken, M., y Rogiers, V. (Ed). *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*. Bruselas, Bélgica. Springer Science, Business Media.
- Trung, T. (2008). Mycotoxins in maize in Vietnam. *World mycotoxin Journal*, vol. 1, p. 87-94.
- Turner, N., Bramhmbhatt, H., Szabo, M., Poma, A., Coker, R., Piletsky, S.A. (2015). Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009-2014). *Anal. Chim. Acta*. Vol. 901, p. 12-33.
- Turner, P.C., Rothwell, J.A., White, K.L.M., Gong, Y.Y., Cade, J.E., Wild, C.P., (2008). Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* Vol. 116, p. 21–25.
- Udomkun, P., Wiredu, A.N., Nagle, M., Bandyopadhyay, R., Müller, J., Vanlauwe, B. (2017). Mycotoxins in Sub-Saharan Africa: Present situation, socio-economic impact, awareness, and outlook. *Food Control*. Vol. 72, p. 110-122.
- USDA. (2015). *Grain: World Markets and Trade*. United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service, Washington, DC.
- Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C., & Jonker, M. A. (2007). Regulations relating to mycotoxins in food: Perspectives in a global and European context. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, 147–157.
- Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. (2011). Ensayos de sensibilidad celular: el ensayo MTT. *Métodos Mol. Biol.* Vol. 731: p. 237–245.
- Vinken, M., and Rogiers, V. (eds.). (2015). *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1250, DOI 10.1007/978-1-4939-2074-7\_5, © Springer Science+Business Media New York.

- Vinken, M., y Blaauboer, B. (2017). In vitro testing of basal cytotoxicity: establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. *Toxicol In Vitro*. Vol. 39, P. 104–110.
- Walle, J.V.D., During, A., Piront, N., Toussaint, O., Schneider, Y.J., Larondelle, Y. (2010). Physio-pathological parameters affect the activation of inflammatory pathways by deoxynivalenol in Caco-2 cells. *Toxicol. In Vitro*. Vol. 24, p. 1890–1898
- Wang, X., Liu, Q., Ihsan, A., Huang, L., Dai, Menghong, Hao, H., Cheng, G., Liu, Z., Wang, Y., Yuan, Z. (2012). JAK/STAT Pathway Plays a Critical Role in the Proinflammatory Gene Expression and Apoptosis of RAW264.7 Cells Induced by Trichothecenes as DON and T-2 Toxin. *Toxicological Sciences*. Vol. 127(2), p. 412–424.
- Wang, X., Xu, W., Fan, M., Meng, T., Chen, X., Jiang, Y., Zhu D., Hu, W., Gong, J., Feng, S., Wu, J., Li, Y. (2016). Deoxynivalenol induces apoptosis in PC12 cells via the mitochondrial pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Vol. 3, P. 193-202
- Wang, Z., Wu., Q., Kuca, K., Dohnal, V., Tian, Z. (2014). Deoxynivalenol: signaling pathways and human exposure risk assessment—an update. *Arch Toxicol*. Vol. 88, p. 915–1928.
- Warth, B., Sulyoka, M., Fruhmann, P., Berthiller, F., Schuhmacher, R., Hametner C., Adamc, G., Fröhlich, J., Krska R. (2012). Assessment of human deoxynivalenol exposure using an LC–MS/MS based biomarker method. *Toxicology Letters*. Vol. 211 P. 85–90.
- Watson, M.L. (1958). Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4: 475-478.

- Wentzel, J., Lombard, M., Du Plessis, L., Zandberg, L. (2016). Evaluation of the cytotoxic properties, gene expression profiles and secondary signalling responses of cultured cells exposed to fumonisin B1, deoxynivalenol and zearalenone mycotoxins. *Archives of Toxicology*, Vol. 91(5), p. 2265–2282.
- Wild, C., Miller, J. D., & Groopman, J. D. (2015). Mycotoxin control in low-and middleincome countries. IARC Working Group Report.
- Wu, F., Groopman, F., Pestka, J. (2014). Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* Vol. 5, P. 351–72.
- Wu, Q., Wang, X., Nepovimova, E., Wang, Y., Yang, Li, L., Zhang, X., Kuca, K. (2017). Antioxidant agents against trichothecenes: new hints for oxidative stress treatment. *Oncotarget*, Vol. 8, (No. 66), p. 110708-110726.
- Wu, Q., Wang, X., Yang, W., Nüssler, A., Xiong, L., Kuca, K., Dohnal, V., Zhang, X., Yuan, Z. (2014b). Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Arch Toxicol.* Vol. 88(7), p. 1309–1326.
- Xu, X., Lai, Y., Hua, Z. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, Vol. 39(1). doi: 10.1042/BSR20180992
- Yang, J., Wang, J., Guo W., Ling, A., Luo, A., Liu, D., Yang, X., Zhao, Z. (2019). Toxic effects and possible mechanisms of deoxynivalenol exposure on sperm and testicular damages in BALB/c mice. *J. Agric. Food Chem.* DOI: 10.1021/acs.jafc.8b04783
- Yang, L., Zhang, J., Zhao, G., Wu, C., Ning, Y., Guo, X., Wang, X., Lammi, M. (2017). Gene expression profiles and molecular mechanism of cultured human chondrocytes exposure to T-2 toxin and deoxynivalenol. *Toxicol.* Vol 140, P. 38-44

- Yang, S., Mao, Y., Zhang, H., Xu, Y., An, J., Huang, Z. (2019). The chemical biology of apoptosis: Revisited after 17 years. *European Journal of Medicinal Chemistry*. Vol. 177, p. 63-75.
- Yang, S., Wang, Y., Beier, R.C., Zhang, H., De Ruyck, K., Sun, F., Cao, X., Shen, J., Zhang, S., Wang, Z., (2015). Simultaneous determination of type A and B trichothecenes and their main metabolites in food animal tissues by ultraperformance liquid chromatography coupled with triple-quadrupole mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 63, p. 8592-8600.
- Yang, W., Yu, M., Fu, J., Bao, W., Wang, D., Hao, L., Yao, P., Nüssler, A., Yan, H., Liu, L. (2014). Deoxynivalenol induced oxidative stress and genotoxicity in human peripheral blood lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* Vol. 64, P. 383–396.
- Yu, M., Wei, Z.-Y., Xu, Z.-H., Pan, J.-Q., & Chen, J.-H. (2018). Oxidative Damage and Nrf2 Translocation Induced by Toxicities of Deoxynivalenol on the Placental and Embryo on Gestation Day 12.5 d and 18.5 d. *Toxins*, Vol. 10(9), p. 370.
- Yuan, L., Mu, P., Huang, B., Li, H., Mu, H., Deng, Y. (2018). EGR1 is essential for deoxynivalenol-induced G2/M cell cycle arrest in HepG2 cells via the ATF3 $\Delta$ Zip2a/2b-EGR1-p21 pathway. *Toxicology Letters*. Vol. 299, p. 95–103.
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, Vol. 15(2), p. 129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>.
- Zhang, L., Pan, Z., Shen, K., Cai, X., Zheng, B., y Miao, S. (2018). Influence of ultrasound-assisted alkali treatment on the structural properties and functionalities of rice protein. *Journal of Cereal Science* Vol. 79; p. 204-209.
- Zhang, L., Zhao, X., Jiang, X., (2015). Sevoflurane Post-conditioning Protects Primary Rat Cortical Neurons Against Oxygen-Glucose Deprivation/Resuscitation: Roles of

- Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 and Bid, Bim, Puma. *Neurochem. Res.* Vol. 40, Pág. 1609-1619.
- Zhang, X., Jiang, L., Geng, C., Cao, J., y Zhong, L. (2009). The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. *Toxicon*. Vol. 54, P. 513–518
- Zhao, Y., Wang, Q., Huang, J., Chen, Z., Liu, S., Wang, X., & Wang, F. (2019). Mycotoxin contamination and presence of mycobiota in rice sold for human consumption in China. *Food Control*, Vol. 98, p. 19–23.
- Zhou, H., George, S., Hay, C., Lee, J., Qian, H., Sun, X. (2017). Individual and combined effects of Aflatoxin B1, Deoxynivalenol and Zearalenone on HepG2 and RAW 264.7 cell lines, *Food and Chemical Toxicology*. Vol. 103, P. 18-27.
- Zigler R.S. (2017). Rice. *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, 2nd edition, Volume 3.