

Efecto Apoptótico y/o Necrótico de Zearalenona en Células Humanas y su Cuantificación en el  
Arroz Cultivado en Norte de Santander



Mayra Yurley Parada Botia

Microbióloga

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Maestría en Biología Molecular y Biotecnología

Universidad de Pamplona

Pamplona

2022

Efecto Apoptótico y/o Necrótico de Zearalenona en Células Humanas y su Cuantificación en el  
Arroz Cultivado en Norte de Santander

Mayra Yurley Parada Botia

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar al título de Magister en Biología  
Molecular y Biotecnología

Director:

Bióloga, M.Sc., Ph.D: Nancy Jaimes Méndez

Co-director:

Microbióloga, M.Sc., PhD: Liliana Rojas Contreras

Universidad de Pamplona

Facultad de Ciencias Básicas

Maestría en Biología Molecular y Biotecnología

Universidad de Pamplona

Pamplona

2022

## **Dedicatoria**

A Dios, a mis padres y hermanos, por ser el pilar de mi vida, por su amor, por esfuerzo, y apoyo incondicional. A mis amigos y compañeros de trabajo que me motivaron quienes de una u otra manera aportaron en la motivación para la conclusión del presente proyecto.

**Mayra**

## **Agradecimientos**

A mi Directora Nancy Jaimes Méndez y Co-directora Liliana Rojas Contreras, por su apoyo, guía y por todo el conocimiento, tiempo y experiencia aportada a este proyecto.

A la Universidad de Pamplona, por darme la oportunidad de seguir creciendo a nivel personal y profesional

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

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

Al Instituto de Inmunología Clínica (Mérida, Venezuela).

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

**Mayra**

## Contenido

	<b>P.</b>
Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción .....	11
 Capítulo I .....	 14
1. Título.....	14
1.1 Justificación .....	14
1.2 Objetivos .....	16
1.2.1 Objetivo General.....	16
1.2.2 Objetivos Específicos.....	16
 Capítulo II.....	 17
2. Marco Referencial.....	17
2.1 Arroz .....	17
2.2 Legislación Para el Contenido de Zearalenona en Cereales .....	18
2.3 Micotoxinas.....	19
2.3.1 Zearelanona (Zea) .....	22
2.3.2 Métodos de Cuantificación para Zea .....	23
2.4 Ruta Bioquímica de la Síntesis de Zea .....	25
2.5 Apoptosis .....	26
2.5.1 Vía Extrínseca.....	30
2.5.2 Vía Intrínseca O Mitocondrial .....	31
2.5.3 Vía Del Retículo Endoplasmático Intrínseco.....	33
2.6 Necrosis.....	36
2.7 Muerte Celular Apoptótica Y/ O Necrótica Inducida por Micotoxinas.....	39
2.8 Efectos Citotóxicos Inducidos por Zea .....	41
2.9 Apoptosis Inducida por Zea .....	44
2.10 Proliferación Celular por el Ensayo de Mtt .....	47
2.11 Detección de Eventos Bioquímicos, Moleculares y Morfológicos de la Apoptosis.....	49

2.12 Muerte Celular por Citometría de Flujo.....	52
2.13 Translocación de la Fosfatidilserina y Fragmentación de ADN.....	55
2.14 Análisis del Potencial de Membrana Mitocondrial con Dioc6.....	57
2.15 Microscopía Electrónica de Transmisión (Met).....	58
Capitulo III.....	61
3. Diseño Metodológico.....	61
3.1 Área de Estudio.....	61
3.2 Muestreo.....	62
3.3 Cuantificación de Zearalenona por HPLC.....	63
3.3.1 Condiciones Cromatográficas (HPLC).....	64
3.4 Aislamientos de Hongos del Género <i>Fusarium Spp</i> .....	65
3.5 Liofilización de Zearalenona.....	66
3.6 Cultivo de la Línea Celular Hepg <sub>2</sub> .....	66
3.7 Ensayo Citotoxicidad.....	67
3.8 Concentración Inhibitoria (Ci <sub>50</sub> ).....	67
3.9 Detección de la Muerte Celular por Microscopía Electrónica de Transmisión (Met).....	68
3.10 Extracción de Neutrófilos Polimorfonucleares (Pmn).....	68
3.11 Características de la Muerte Celular Por Citometría De Flujo.....	69
3.12 Detección De La Fosfatidilserina y Análisis de la Fragmentación de ADN.....	69
3.13 Análisis del Potencial de Membrana Mitocondrial.....	70
3.14 Análisis Estadístico.....	70
Capitulo IV.....	72
4. Resultados y Discusión.....	72
4.1 Cuantificación de Zearalenona.....	72
4.2 Aislamiento de <i>Fusarium Spp</i> .....	74
4.3 Efecto de la Citotoxicidad de Zea Sobre Células Hepg <sub>2</sub> .....	78
4.4 Cambios Morfológicos en Células Hepg <sub>2</sub> Causados por Zea.....	82
4.5 Características de la Muerte Celular en Neutrófilos Polimorfonucleares por Zea.....	84

Conclusiones .....	92
Recomendaciones .....	94
Referentes Bibliográficos.....	95

**Lista de tablas****P.**

Tabla 1. <i>Condiciones óptimas de temperatura y actividad de agua (Aw) para la producción de micotoxinas en granos y cereales</i> .....	20
Tabla 2. <i>Marcadores para la detección de la etapa temprana y tardía de la apoptosis</i> .....	49
Tabla 3. <i>Procedencia y codificación de las muestras de arroz de cultivo</i> .....	63
Tabla 4. <i>Cuantificación de ZEA en las muestras de arroz en cultivo</i> .....	73
Tabla 5. <i>Comparación del crecimiento micelial de Fusarium sp</i> .....	76

## Lista de figuras

	<b>P.</b>
Figura 1. <i>Estructura química de micotoxinas transmitidas por alimentos</i> .....	19
Figura 2. <i>Estructura química de Zearalenona (ZEA)</i> .....	23
Figura 3. <i>Ruta biosintética de ZEA</i> .....	26
Figura 4. <i>Apoptosis celular</i> .....	29
Figura 5. <i>Morfología de células en apoptosis</i> .....	30
Figura 6. <i>Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis</i> .....	33
Figura 7. <i>Vía apoptótica del retículo endoplasmático</i> .....	35
Figura 8. <i>Eventos morfológicos y bioquímicos de la muerte celular por necrosis</i> .....	38
Figura 9. <i>ZEA y sus derivados pueden ejercer efectos similares al estrógeno que pueden estimular la proliferación celular</i> .....	43
Figura 10. <i>Mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por ZEA</i> .....	47
Figura 11. <i>Ensayo MTT para la viabilidad celular. Reducción del MTT a formazán</i> .....	48
Figura 12. <i>Esquema general de la citometría de flujo</i> .....	54
Figura 13. <i>Detección de apoptosis basado en la Anexina V</i> .....	56
Figura 14. <i>Detección de apoptosis mediada por los marcadores Anexina V/FITC y yoduro de propidio (IP)</i> .....	57
Figura 15. <i>Esquema de un microscopio electrónico de transmisión</i> .....	59
Figura 16. <i>Área de estudio, municipios de muestreo en Norte de Santander</i> .....	61
Figura 17. <i>Cromatogramas por HPLC</i> .....	65
Figura 18. <i>Características macroscópicas de Fusarium sp.</i> .....	75
Figura 19. <i>Características microscópicas de Fusarium spp</i> .....	78
Figura 20. <i>Evaluación de la actividad metabólica en las células HepG2 por reducción de MTT</i> .....	79
Figura 21. <i>Proliferación de las células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones de ZEA (1, 2.5, 5, 10 y 15 <math>\mu</math>M)</i> .....	80
Figura 22. <i>Microscopía electrónica de transmisión de las células HepG2 expuestas a 10 <math>\mu</math>M de ZEA durante 48 horas</i> .....	83

Figura 23. <i>Detección de la fosfatidilserina en células PMN mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V-FITC, durante 2 horas de tratamiento con ZEA a una concentración de 6,40 <math>\mu</math>M</i> .....	84
Figura 24. <i>Porcentaje de células PMN positivas para Anexina V-FITC, tratadas con una concentración de 6,40 <math>\mu</math>M de ZEA</i> .....	85
Figura 25. <i>Análisis del nivel de fragmentación del ADN en células PMN mediante citometría de flujo por tinción con yoduro de propidio (IP), durante 2 horas de tratamiento con ZEA, a una concentración de 6,40 <math>\mu</math>M</i> .....	86
Figura 26. <i>Porcentaje de células PMN con fragmentación de ADN relacionada con apoptosis tardía y necrosis, tratadas con una concentración de 6,40 <math>\mu</math>M de ZEA</i> .....	87
Figura 27. <i>Evaluación del potencial de membrana en células PMN por tinción con DIOC6 mediante citometría de flujo durante 2 horas de tratamiento con ZEA, a una concentración de 6,40 <math>\mu</math>M</i> .....	89
Figura 28. <i>Porcentaje de células PMN con pérdida del potencial de membrana tratadas con una concentración de 6,40 <math>\mu</math>M de ZEA</i> .....	89

## Resumen

Las micotoxinas son metabolitos secundarios, sintetizados por diferentes especies de hongos filamentosos, siendo los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, los contaminantes micotoxigénicos más relevantes. Se encuentran frecuentemente como contaminantes naturales en una amplia variedad de alimentos (leche, frutos secos, granos, cereales y derivados) y piensos, representando un riesgo para la salud humana y animal. Por lo tanto, en el presente estudio se cuantificó y se estableció la presencia de ZEA en 3 muestras de arroz de cultivo (M009: 98 µg/Kg, M010: 167 µg/Kg y M011: 490 µg/Kg) de 4 municipios de Norte de Santander por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC); a su vez, se pudo establecer la presencia de *Fusarium* sp., presuntivamente, teniendo en cuenta la caracterización fenotípica de acuerdo a la morfología macroscópica, microscópica y crecimiento micelial, en tres medios de cultivo (PDA, Avena, DG18). Adicionalmente, se evaluó el efecto citotóxico de un patrón de ZEA (10 µg/ml), mediante el ensayo de viabilidad (MTT), y la inducción de cambios morfológicos por microscopía electrónica de transmisión (MET) en la línea celular HepG<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos indicaron, que ZEA causó una disminución de la actividad metabólica, una reducción significativa en los porcentajes de proliferación celular ( $p < 0,0001$ ), de manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición; y la inducción de cambios morfológicos característicos de la muerte celular por apoptosis. Por citometría de flujo se evaluaron los cambios bioquímicos como externalización de la fosfatidilserina, fragmentación del ADN y pérdida del potencial de membrana mitocondrial, en células polimorfonucleares (PMN). Los resultados indicaron que ZEA, desencadena una serie de eventos de muerte celular, característicos del proceso apoptótico.

**Palabras clave:** Arroz; citotoxicidad; *Fusarium*; muerte celular; Zearalenona.

## Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites, synthesized by different species of filamentous fungi, the genera *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium*, are the most relevant mycotoxigenic contaminants. They are frequently found as natural contaminants in a wide variety of foods (milk, nuts, grains, cereals and derivatives) and feed, representing a risk to human and animal health. Therefore, in the present study, the presence of ZEA was quantified and established in 3 cultivated rice samples (M009: 98 µg/Kg, M010: 167 µg/Kg and M011: 490 µg/Kg) from 4 municipalities of Norte de Santander by high performance liquid chromatography (HPLC); in turn, the presence of *Fusarium* sp. could be established, presumptively, taking into account the phenotypic characterization according to macroscopic and microscopic morphology and mycelial growth, in three culture media (PDA, Oatmeal Agar, DG18). Additionally, the cytotoxic effect of a ZEA pattern (10 µg/ml) was evaluated by means of the viability assay (MTT), and the induction of morphological changes by transmission electron microscopy (TEM) in the HepG<sub>2</sub> cell line. The results obtained indicated that ZEA caused a decrease in metabolic activity, a significant reduction in the percentages of cell proliferation ( $p < 0.0001$ ), depending on the concentration and exposure time; and the induction of morphological changes characteristic of cell death by apoptosis. Biochemical changes such as externalization of phosphatidylserine, DNA fragmentation and loss of mitochondrial membrane potential in polymorphonuclear cells (PMN) were evaluated by flow cytometry. The results indicated that ZEA triggers a series of cell death events, characteristic of the apoptotic process.

**Keywords:** Rice; cytotoxicity; *Fusarium*; cell death; Zearalenone.

## Introducción

El arroz es considerado uno de los granos más importantes para el consumo aproximadamente del 75% de la población mundial (Savi et al. 2018). Suelen estar contaminados por hongos filamentosos que pueden producir micotoxinas cancerígenas como metabolitos secundarios, durante la cosecha y el almacenamiento (Alshannaq y Yu, 2017), por lo tanto, se considera una preocupación mundial constante, ya que afecta la seguridad, calidad y las propiedades de los granos de arroz (Chandravarnan et al. 2022). Generalmente, los cereales y derivados, especialmente trigo, avena, maíz, cebada, mijo, sorgo y arroz, son más susceptibles a la contaminación de manera natural por micotoxinas como ZEA, detectándose en altos niveles, en muestras de alimentos destinados a consumo animal; debido a su almacenamiento inadecuado, produciéndose especialmente en climas templados y cálidos antes de la cosecha, pero también en malas condiciones de almacenamiento (D'Mello et al. 1999; Mally et al. 2016; Golge y Kabak, 2020).

Zearalenona (ZEA), es una micotoxina policetida, producida por varias especies del hongo *Fusarium*, sintetizada principalmente por *Fusarium graminearum* (teleomorfo *Gibberella zae*) (Gupta et al. 2018). ZEA tiene una masa molecular de 318,364 g/mol y es un compuesto débilmente polar, cristalino de color blanco, el cual exhibe una fluorescencia verde/azul a una excitación con luz UV de longitud de onda de 360 nm y fluorescencia verde a una excitación UV de longitud de onda de 260 nm (Rogowska et al. 2019).

Es termoestable y no se degrada por procesos como molienda, extrusión, almacenamiento o calentamiento (Gromadzka et al. 2008; Ben et al. 2020). Bottalico (1998) ha informado la presencia de ZEA y sus derivados en niveles de hasta 2.758 µg / kg y hasta 175 µg / kg en granos de cereales en todo el mundo y en países europeos, respectivamente.

Tiene múltiples efectos tóxicos, principalmente hiperestrogénicos, pero también es hepatotóxica, hematotóxica, inmunotóxica, genotóxica y carcinógena (Zhou et al. 2015; Virk et al. 2020), induciendo eventos tales como estrés oxidativo, aberraciones cromosómicas, fragmentación del ADN, producción de micronúcleos e inhibición de la síntesis de proteínas y ADN (Ouanes et al. 2003; Abid-Essefi et al. 2004; Abbès et al. 2007; Shi et al. 2017; Kowalska et al. 2019). En un estudio de Lioi et al., (2004) se demostró que ZEA también es genotóxico e induce la formación de aductos de ADN en cultivos *in vitro* de linfocitos bovinos.

ZEA también puede inducir apoptosis *in vivo* e *in vitro* (Vlata et al. 2006; Rajendran et al. 2021). La apoptosis o muerte celular programada, es un proceso celular genéticamente controlado, en el cual células inducen su propia muerte en respuesta a determinados estímulos, además, es esencial para el mecanismo mantenimiento de la homeostasis tisular (Hongmei, 2012).

La muerte celular apoptótica se desencadena por la interacción entre los ligandos y los receptores de muerte extrínsecos de la membrana o por la vía intrínseca mediada por mitocondrias (Langerak y Russell, 2011; Obeng, 2020), la cual se inicia por procesos intracelulares, como el estrés celular, y conduce a la liberación del citocromo C de las mitocondrias. El citocromo, a su vez, activa la apoptosis a través de una serie de reacciones en cascada en la célula, con una variedad de características morfológicas tales como: pérdida de asimetría de la membrana, condensación del citoplasma y núcleo, aumento del calcio en el citosol, y formación de cuerpos apoptóticos que finalmente son eliminados por células fagocíticas (Branzei y Foiani, 2008; Liu et al. 2009; Hongmei, 2012).

En estudios realizados en células Vero, Caco-2 y DOK, tratadas con ZEA (10-40  $\mu\text{M}$ ), se evidenció que produce apoptosis por la fragmentación del ADN y la presencia de cuerpos

apoptóticos (Abid-Essefi et al. 2003). Además, se ha demostrado que ZEA induce la apoptosis en hepatocitos humanos (HepG<sub>2</sub>) a través de la vía de señalización mitocondrial dependiente de p53 con la regulación de ATM y GADD45, implicados en la reparación del ADN (Ayed-Boussema et al. 2008).

El objetivo de esta investigación fue cuantificar la concentración de ZEA en arroz de cultivo de 4 municipios de Norte de Santander y determinar su efecto citotóxico sobre células humanas a diferentes concentraciones y tiempos de tratamiento.

## **Capítulo I**

### **1. Título**

Efecto apoptótico y/o necrótico de Zearelanona en células humanas y su cuantificación en el arroz cultivado en norte de Santander.

#### **1.1 Justificación**

El arroz es un producto agrícola básico de la canasta familiar. Suele estar contaminado por hongos productores de metabolitos secundarios como las micotoxinas. Según los reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), aproximadamente el 25% de la producción de alimentos está contaminada, al menos con una micotoxina. Los alimentos contaminados con micotoxinas, son considerados fuente de enfermedades según la Organización Mundial de la Salud (OMS), ya que son citotóxicas, hepatotóxicas, y genotóxicas, induciendo la muerte celular por apoptosis o necrosis (Consejo Ejecutivo, 2002; Marin et al. 2013). Con el fin de estudiar los efectos citotóxicos de las micotoxinas en humanos y animales, así como de proteger la salud humana y los intereses económicos de los productores, muchos países han fijado legislaciones en cuanto a valores permisibles (Nutrition Division, 2003).

En Colombia, la investigación en cuanto a los niveles máximos de micotoxinas permitidos en alimentos, se ha tratado en forma tangencial (Duarte-Vogel y Villamil-Jiménez, 2006), por lo tanto, se requiere de estudios exhaustivos que permitan establecer rangos de acuerdo al tipo y características de los diferentes alimentos, así mismo establecer una relación de los posibles efectos tóxicos al interior celular. No obstante, los estudios realizados en el país han

demostrado que la contaminación de alimentos por algunas micotoxinas es significativa y se deben formular políticas sanitarias para afrontar esta limitante (Morris, 2011; Rojas, 2021).

En consecuencia, es necesario desarrollar investigaciones que permitan obtener registros de los tóxicos y de las concentraciones, en las que se encuentran las micotoxinas como ZEA, producidas por hongos presentes en el arroz de la región de Norte de Santander, y los efectos citotóxicos como apoptosis o necrosis, que pueden causar en células humanas como HepG<sub>2</sub> y polimorfonucleares.

Como se menciona anteriormente, esta investigación, va a dar lugar a la generación del conocimiento de datos, que pueden ser utilizados como referentes para el desarrollo y la implementación de normas nacionales o medidas preventivas por parte de los organismos de control como el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos –INVIMA-, entes territoriales de salud (ETS) y el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), con el fin de proporcionar información sobre la calidad del producto y evitar efectos negativos en la salud de la población consumidora.

Por lo anteriormente mencionado se establecen las siguientes preguntas de investigación: ¿La micotoxina ZEA está presente en el arroz cultivado en Norte de Santander? ¿ZEA puede ejercer un efecto apoptótico y/o necrótico en las células humanas (HepG<sub>2</sub> y polimorfonucleares)?

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo general

Cuantificar la concentración de ZEA en arroz de cultivo de 4 municipios de Norte de Santander y determinar su efecto citotóxico sobre células humanas.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Cuantificar la concentración de Zearalenona en las muestras de arroz en cultivo de 4 municipios de Norte de Santander.

Aislar e identificar el hongo toxigénico del género *Fusarium* en las muestras de arroz en cultivo procedente de 4 municipios de Norte de Santander.

Determinar la concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub>) de ZEA y su efecto sobre la proliferación en la línea celular HepG<sub>2</sub>.

Verificar mediante microscopía electrónica de transmisión, los cambios morfológicos específicos de la apoptosis o necrosis en las células HepG<sub>2</sub>.

Evaluar las características relacionadas con la muerte celular, causadas por ZEA en células polimorfonucleares (PMN).

## Capítulo II

### 2. Marco referencial

A continuación, se expone la fundamentación teórica de los conceptos básicos e investigaciones que soportan y orientan el presente estudio.

#### 2.1 Arroz

El arroz (*Oryza sativa*) es una gramínea de cosecha anual, originaria del continente asiático. Constituye el cereal de mayor consumo para aproximadamente la mitad de la población mundial, siendo cultivado en 113 países (Abbas et al. 2011; FAO - 28<sup>a</sup> Conferencia regional de la FAO para América Latina y el Caribe, s. f.). En Colombia, es el segundo cultivo más importante después del café, y uno de los alimentos básicos en la dieta como fuente de carbohidratos, por su alto valor calórico y proteico (Fedearroz, 1998).

El cultivo de arroz depende básicamente de los nutrientes, la humedad y el clima, dado que es típico de zonas húmedas tropicales o subtropicales, la temperatura óptima debe estar entre un mínimo de 32 y 34°C, y un máximo de 40 y 42°C (Aldana, 2001), con un rango de humedad relativa entre un 54% a 87% y normalmente altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1.500 metros (DANE, 2017). En Norte de Santander, se siembra arroz en 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, agrupando un área de producción de 14.200 hectáreas cultivadas por el sistema de riego, cuya fuente de suministro es el río Zulia (Fedearroz, 2012). Cabe destacar que, la calidad de los granos de arroz destinados al consumo humano o animal, depende de factores como condiciones climáticas, composición y buenas prácticas agrícolas, debido a que son propensos a la contaminación y colonización por hongos,

ocasionando la producción de metabolitos secundarios de estructura química muy diversa denominados micotoxinas (Magan et al., 2003; Paterson y Lima, 2010). En efecto, los principales hongos toxigénicos presentes en el arroz son *Aspergillus* spp. (Reddy et al. 2004), *Fusarium* spp (Ok et al. 2014) y *Penicillium* spp (Makun et al. 2007).

## **2.2 Legislación para el contenido de Zearalenona en cereales**

Actualmente, los niveles máximos vigentes de contaminantes destinados para el consumo de cereales a nivel europeo se encuentran contemplados en el Reglamento (CE) No. 1126/2007 de la comisión del 28 de septiembre de 2007; por el cual se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios por lo que se refiere a las toxinas de *Fusarium* en el maíz y los productos del maíz. Establece como límite máximo permitido, concentraciones de ZEA en “Cereales no elaborados distintos al maíz” de 100 µg/kg. Sin embargo, a efectos de la aplicación de ésta micotóxina, el arroz no se incluye en los “cereales” y los productos de arroz no están incluidos en "productos de cereales".

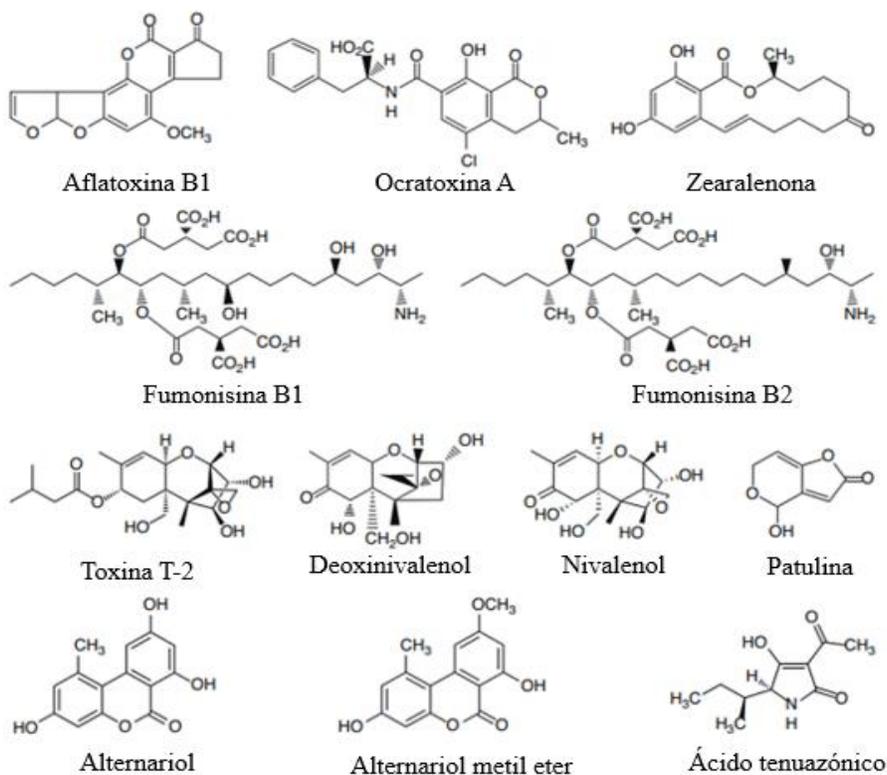
En Colombia, la Resolución del Ministerio de Salud y Protección Social No. 4506 de 2013, establece los niveles máximos de contaminantes en los alimentos destinados al consumo humano y se dictan otras disposiciones (MSPS, 2013). Esta normativa contempla que el contenido máximo se aplica a los cereales no elaborados comercializados para una primera fase de transformación y especifica que, para los efectos de la aplicación de los contenidos máximos de ZEA, el arroz no se incluye en los «cereales» y tampoco los productos a base de arroz en los «productos a base de cereales». Para ZEA, el límite máximo permitido para “Cereales no elaborados distintos al maíz” es de 100 µg/kg.

## 2.3 Micotoxinas

Las micotoxinas constituyen un grupo heterogéneo de metabolitos secundarios de bajo peso molecular (<500 Da), comúnmente termoestables, producidos principalmente por algunos hongos filamentosos o mohos (Bennett y Klich, 2003; Kiš et al., 2021), además, son moléculas policetónicas que se sintetizan principalmente cuando el hongo alcanza la madurez. Estas moléculas, presentan estructuras que varían desde simples anillos heterocíclicos, hasta grupos con 6-8 anillos heterocíclicos dispuestos irregularmente (figura 1) (Bezerra da Rocha et al. 2014).

### Figura 1.

*Estructura química de micotoxinas transmitidas por alimentos*



Fuente: Patriarca y Fernández (2017)

Cabe señalar que las micotoxinas pueden desarrollarse bajo condiciones adecuadas de temperatura y humedad (Milani, 2013; Daou et al. 2021), siendo contaminantes naturales de muchos alimentos principalmente cereales y granos (tabla 1), aunque, pueden estar presentes tanto en cultivo, como en la cosecha y durante el almacenamiento (Yazar y Omurtag, 2008; Iqbal et al. 2014; Manizan et al. 2018), así como también en frutas, nueces, forraje, y alimentos destinados al consumo animal (Zain, 2011; Moretti et al. 2017). De igual manera, las prácticas agronómicas inadecuadas, el sistema de cultivo, y las condiciones de recolección a nivel de cosecha, almacenamiento, manipulación y procesamiento, pueden causar estrés y predisponer a las plantas en la contaminación por micotoxinas (Channaiah y Maier, 2014; Neme y Mohammed, 2017; Omotayo et al., 2019).

**Tabla 1.**

*Condiciones óptimas de temperatura y actividad de agua ( $A_w$ ) para la producción de micotoxinas en granos y cereales*

<b>Micotoxina</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Actividad de agua (<math>A_w</math>)</b>	<b>Granos o cereales</b>
Zearalenona	25	0.96	Maíz, trigo, cebada, centeno, arroz
Aflatoxinas	30	0.96	Maíz, trigo, algodón, nueces
Ocratoxinas	25-30	0.80 - 0.98	Trigo, cebada, avena, frijoles secos
Fumonisina	15-30	0.9 - 0.99	Maíz, trigo, sorgo, cebada, avena
Deoxinivalenol	26-30	0.99	Maíz, trigo, cebada, arroz, avena

Micotoxinas producidas bajo diferentes condiciones de temperatura y  $A_w$  en cereales.  
Adaptado de Marín et al. (1998); Yazar y Omurtag (2008); Milani (2013)

La mayoría de las micotoxinas son relativamente estables al calor dentro del rango de temperatura de procesamiento de alimentos convencional (80 -121°C), por lo tanto, se produce poca o ninguna destrucción en condiciones normales de cocción (Milićević et al. 2010; Singh et al. 2021).

En definitiva, la producción de micotoxinas en los alimentos como los cereales es un fenómeno complejo y multifactorial que depende de la pre y poscosecha, ya que tienen lugar cuando en determinadas condiciones físicas (humedad, temperatura, daño mecánico), químicas (pH, dióxido de carbono, oxígeno, composición del sustrato, biodisponibilidad de micronutrientes) y/o biológicas (variedad de plantas, hongos presentes, daño por insectos, interacciones con otros organismos en el sustrato donde coexisten y carga de esporas), pueden ocasionar en los hongos la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos. Los ácidos grasos (metabolitos primarios) 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 (Gimeno y Martins, 2011; Bryden, 2012; Smith et al. 2016; Patriarca y Fernández, 2017).

Cabe destacar que, son consideradas sustancias tóxicas cuando están presentes en alimentos para humanos y animales, produciendo varios efectos agudos y crónicos, dependiendo de la especie (Bennett y Klich, 2003; Zain, 2011). Dentro de una especie determinada, el impacto de las micotoxinas en la salud depende de la concentración, la duración de la exposición a la toxina, la toxicidad del compuesto (efectos agudos y crónicos), la edad, el sexo, el peso corporal, la dieta, la exposición a agentes infecciosos y la presencia de otras micotoxinas (efectos sinérgicos) (Milićević et al. 2010; Zain, 2011). Por lo tanto, son capaces de alterar las actividades inmunomediadas y hemotológicas, afectar el sistema gastrointestinal en animales o producir

efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos, cancerígenos, hematológicos, nefrotóxicos, hepatotóxicos y estrogénicos agudos, dependiendo del nivel de exposición (Bezerra da Rocha et al, 2014; Iqbal et al, 2014; Manizan et al. 2018). Las micotoxinas tienen efectos citotóxicos sobre el ADN, el ARN y la síntesis de proteínas, y su acción proapoptótica puede provocar cambios funcionales (Kharayat y Singh, 2018).

Se conocen más de 300 micotoxinas, sin embargo, sólo algunas representan una amenaza real para la inocuidad de los alimentos y son consideradas de interés para la salud pública basadas en su toxicidad y pérdidas económicas (Broom, 2015). Entre las más relevantes en cereales y productos a base de cereales se encuentran las aflatoxinas (AFs), zearalenona (ZEA), la ocratoxina A (OTA), las fumonisinas (FBs), y los tricotecenos como deoxinivalenol (DON) (Abrunhosa et al. 2016; Khodaei et al., 2021).

### **2.3.1 Zearelanona (ZEA)**

Es una micotoxina estrogénica no esteroide, producida como metabolito secundario por una variedad de especies de *Fusarium*, entre las que se encuentran *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellemse*, *F. cerealis*, *F. equiseti* y *F. semitectum*. Cabe señalar que su producción ocurre cuando las temperaturas se encuentran entre 20 - 25°C y valores  $A_w$  entre 0.95 - 0.96, siendo un contaminante regular de los cultivos de cereales en todo el mundo (Bennett y Klich, 2003; Milani, 2013).

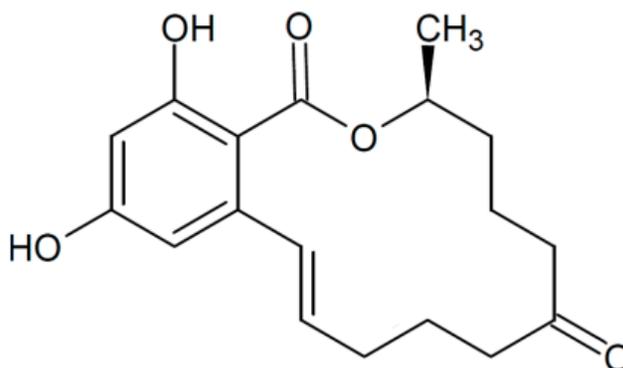
Químicamente ZEA se describe como 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-ácido resorcíclico, con fórmula molecular  $C_{18}H_{22}O_5$  (Bennett y Klich, 2003; García, 2010; Liu y Applegate, 2020). La estructura química de ZEA (figura 2), consiste en un resto de resorcinol fusionado a un anillo de lactona macrocíclica de 14 miembros, que incluye un doble enlace trans,

una cetona y una rama metilo. El nombre trivial dado al compuesto se deriva de la siguiente combinación; zea-r-a-l-en-one que surgen de *Gibberella zeae* (anamorfo *Fusarium graminearum*); -ral por las iniciales de lactonas de ácido resorcílico; -ene que indica la presencia del doble enlace C-1' a C-2'; y -one que indica la presencia de la cetona en C-6. ZEA se absorbe rápidamente y es metabolizado en  $\alpha$ -zearalenol y  $\beta$ -zearalenol (Urry et al, 1966; Shier et al, 2001; Zinedine et al, 2007; Ropejko y Twarużek, 2021).

Después de la absorción de ZEA, esta se metaboliza principalmente en el hígado y el intestino y se transforma en los derivados de  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZEA),  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZEA), zearalanona (ZAN),  $\alpha$ -zearalanol ( $\alpha$ -ZAL) y  $\beta$ -zearalanol ( $\beta$ -ZAL) y los derivados posteriormente se conjugan con ácido glucurónico (Zinedine et al. 2007; Zhang<sup>a</sup> et al, 2018).

## Figura 2.

Estructura química de Zearalenona (ZEA)



Fuente: Ropejko y Twarużek, (2021)

### 2.3.2 Métodos de cuantificación para ZEA

El análisis de micotoxinas generalmente es un proceso de varios pasos que incluye la extracción de toxinas de la matriz con solventes orgánicos polares, limpieza de extractos,

detección y determinación cuantitativa (Rodríguez-Carrasco et al, 2014). De modo que, se han desarrollado diferentes métodos analíticos, para la identificación y cuantificación de ZEA y otras micotoxinas; como la cromatografía en capa fina (CCF) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Lin et al. 1998; Rodríguez-Carrasco et al. 2014; Tamura et al. 2015).

La cromatografía en capa fina (CCF) es un tipo de cromatografía líquida en la que la fase estacionaria es una capa delgada de un adsorbente polar (silica gel) de partículas finas, sobre una superficie sólida (placa de vidrio, papel aluminio o lamina de plástico). La solución de la muestra, se aplica en la parte inferior de la placa, la cual se introduce en una cámara cerrada, cuya base se cubre con la fase móvil (mezcla de solventes), que transporta los solutos a través de la fase estacionaria por capilaridad, a lo largo de la placa, permitiendo la separación de los productos presentes en la muestra, que son revelados con un indicador fluorescente que absorbe la luz ultravioleta (254 nm) y emite luz visible, o con el uso de un agente revelador (Sherma y Fried, 2005).

En cuanto a la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), es una técnica de separación, que permite analizar los componentes químicos de una mezcla. Consiste en pasar la muestra disuelta en la fase móvil por una columna cromatográfica, a través de una fase estacionaria (no polar). Las interacciones específicas entre las moléculas de la muestra y las fases, determinan el tiempo requerido para que un analito viaje a través de la columna después de la inyección hasta llegar al detector, el cual se denomina tiempo de retención ( $t_R$ ). Los resultados se muestran en cromatogramas, que incluyen la información proporcionada por el detector (Lozano-Sánchez et al. 2018).

Estudios han evidenciado la cuantificación de ZEA en diferentes tipos de cereales. Hadiani et al. (2003) por CCF, detectaron a ZEA en muestras de maíz con un valor de  $100 \text{ ng g}^{-1}$ .

Por otro lado, Zaied et al. (2012), utilizaron HPLC para el análisis cuantitativo de ZEA en trigo. Los datos obtenidos mostraron que la incidencia de contaminación por ZEA fue del 75 % y los niveles de contaminación determinados oscilaron entre 3 y 560 mg/kg con un valor medio de 60 mg/kg. En Polonia, la contaminación del trigo por ZEA fue confirmada por Perkowski et al. (1990) con niveles de hasta 2000 µg/kg.

#### **2.4 Ruta bioquímica de la síntesis de ZEA**

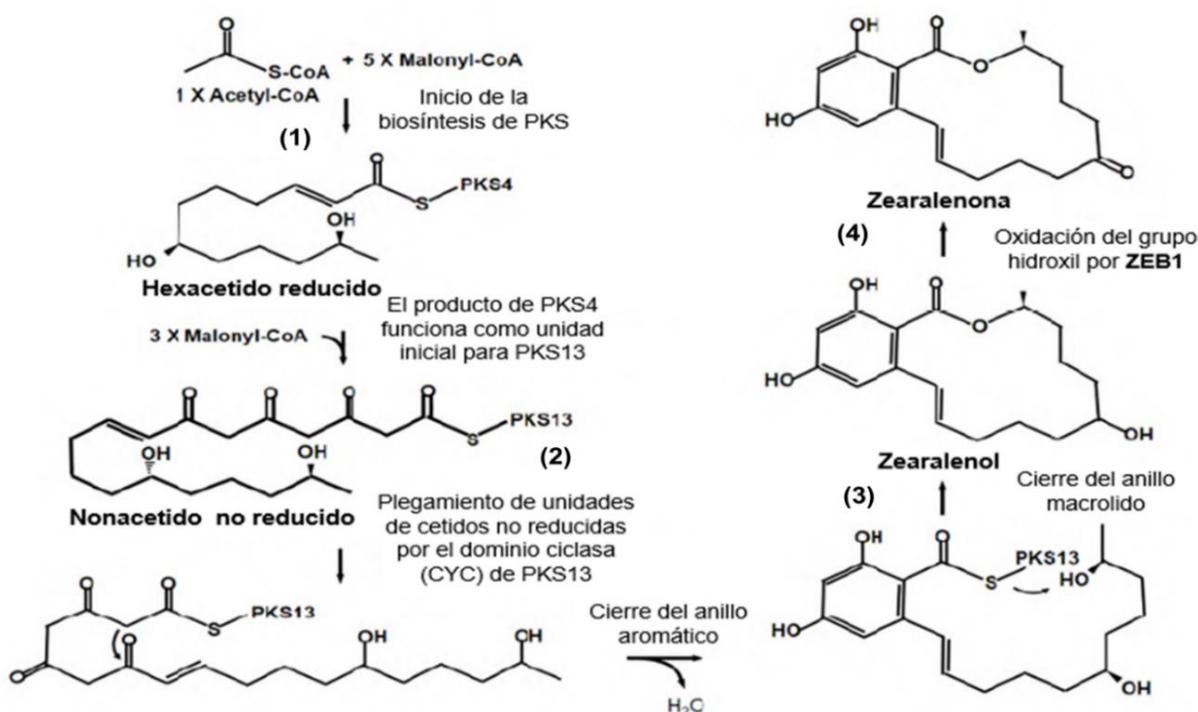
ZEA es un metabolito secundario biosintetizado a través de la vía de los policétidos, por complejos enzimáticos denominados policétido sintasas (PKS) (Hansen et al. 2012). La síntesis de ZEA se da por acción combinada de un grupo de genes biosintéticos *PKS4*, *PKS13*, *ZEB1* y *ZEB2* (Gaffoor y Trail, 2006). El gen *PKS4* codifica para una policétido sintasa reductora, *PKS13* codifica para una policétido sintasa no reductora, *ZEB1* codifica una isoamil alcohol oxidasa que se requiere para la conversión de  $\beta$ -zearalenol en ZEA y *ZEB2* es un factor de transcripción que tiene un dominio de unión a ADN el cual consiste en una región básica que lleva una cremallera de leucina (bZIP) (Kim et al. 2005; Kim et al. 2018; Stakheev et al., 2022).

La ruta biosintética es iniciada por *PKS4* (1), que cataliza la condensación de carbonos a partir de un acetilCoA y cinco moléculas de malonil CoA, dando como resultado la formación de un hexacetido (Kim et al. 2005; Gaffoor y Trail, 2006). (2) *PKS13*, extiende la cadena de ZEA agregando tres moléculas de malonil-CoA, dando como resultado un nanocetido (Park et al. 2015). (3) Las cetonas no reducidas, sufren reacciones aromáticas intramoleculares, causando la formación de un anillo aromático y un anillo macrólido que contiene un enlace lactona (Gaffoor y Trail, 2006). (4) La conversión de  $\beta$ -zearalenol a ZEA está catalizada por *ZEB1*, con *ZEB2*

actuando como un potencial transcripcional activador de genes que regulan la biosíntesis de ZEA (figura 3) (Kim et al. 2005; Kim et al. 2018; Stakheev et al., 2022).

### Figura 3.

#### Ruta biosintética de ZEA



Adaptado de Kim et al. (2018)

## 2.5 Apoptosis

La apoptosis, ha sido reconocida y aceptada como un modo distintivo e importante de "muerte celular genéticamente programada", que se produce normalmente durante el desarrollo y el envejecimiento como un mecanismo homeostático para mantener poblaciones de células en los tejidos (Elmore, 2007; Hassan et al. 2014; D'Arcy, 2019). También, se produce como mecanismos de defensa, en el caso de las reacciones inmunitarias o cuando las células son

dañadas por enfermedad o agentes nocivos (Formigli et al. 2000). Aunque hay una amplia variedad de estímulos y condiciones, tanto fisiológicos como patológicos, que pueden desencadenar la apoptosis, no todas las células mueren necesariamente en respuesta al mismo estímulo (Elmore, 2007).

La apoptosis es un proceso coordinado y activado por diversas señales extrínsecas e intrínsecas (figura 4), a través de una secuencia bien definida de cascadas de señalización, a menudo dependiente de energía, en donde las células apoptóticas exhiben tanto modificaciones bioquímicas como morfológicas (Johnstone et al. 2002; D'Arcy, 2019).

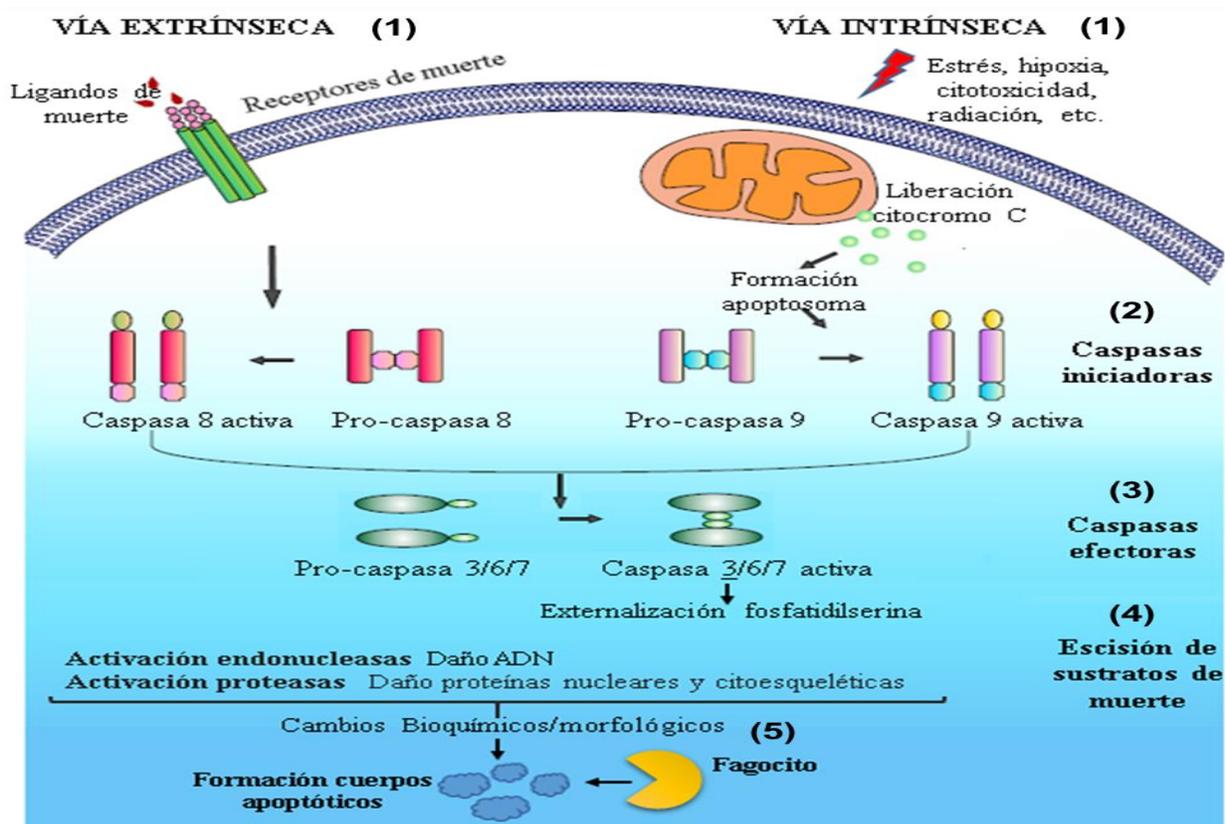
Los estímulos proapoptóticos permiten la activación de la maquinaria molecular central de la apoptosis por medio de dos vías principales: (1) una vía a través de receptores de muerte tales como el TNFR-1 activados por ligandos como el FasL (vía extrínseca) o por una vía mitocondrial (vía intrínseca) que integra las señales apoptóticas causadas por diversos agentes citotóxicos, estrés celular, lesión en el ADN, expresión de p53, como también por la regulación de proteínas de la familia Bcl2 y la liberación del citocromo C. En los últimos años, se ha descrito una tercera vía que desencadena la apoptosis a través del retículo endoplasmático (Kroemer et al. 1997; Green y Reed, 1998; Igney y Krammer, 2002; Jin y El-Deiry, 2005; Hu et al. 2019).

Una vez que el daño celular se detecta, se desencadena una cascada proteolítica, que amplifica la vía de señalización de la apoptosis gracias a la acción de las caspasas; un grupo de proteínas perteneciente a las cisteín-proteasas, que contienen un residuo de cisteína que media la ruptura de otras proteínas. Las caspasas están normalmente presentes como proenzimas inactivas en la mayoría de las células, (2) las cuales activan las caspasas iniciadoras 2, 8, 9, y 10, (3) y pasan a escindir y activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, encargadas de la fase de ejecución de

la apoptosis (Amarante-Mendes et al. 1998; Hengartner, 2000; Norbury y Hickson, 2001; Ziegler y Groscurth, 2004; D'Arcy, 2019). (4) Posteriormente, el núcleo se divide en varios fragmentos por la activación de endonucleasas selectivas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , ocasionando la fragmentación de ADN entre 180 a 200 pb de longitud, además, la destrucción de las proteínas nucleares y del citoesqueleto por acción de proteasas y la expresión de ligandos específicos de la fosfatidilserina para las células fagocíticas. (5) En esta fase de degradación, se hacen evidentes las características bioquímicas y morfológicas, que finalmente conllevan a la formación y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (Martinvalet et al. 2005; Poon et al. 2014; Battistelli y Falcieri, 2020).

A pesar de las diferencias en los mecanismos de iniciación y las moléculas involucradas, ambas vías convergen para producir las alteraciones características de la apoptosis (Kondratskyi et al. 2015; Pistritto et al. 2016).

Figura 4.

*Apoptosis celular*

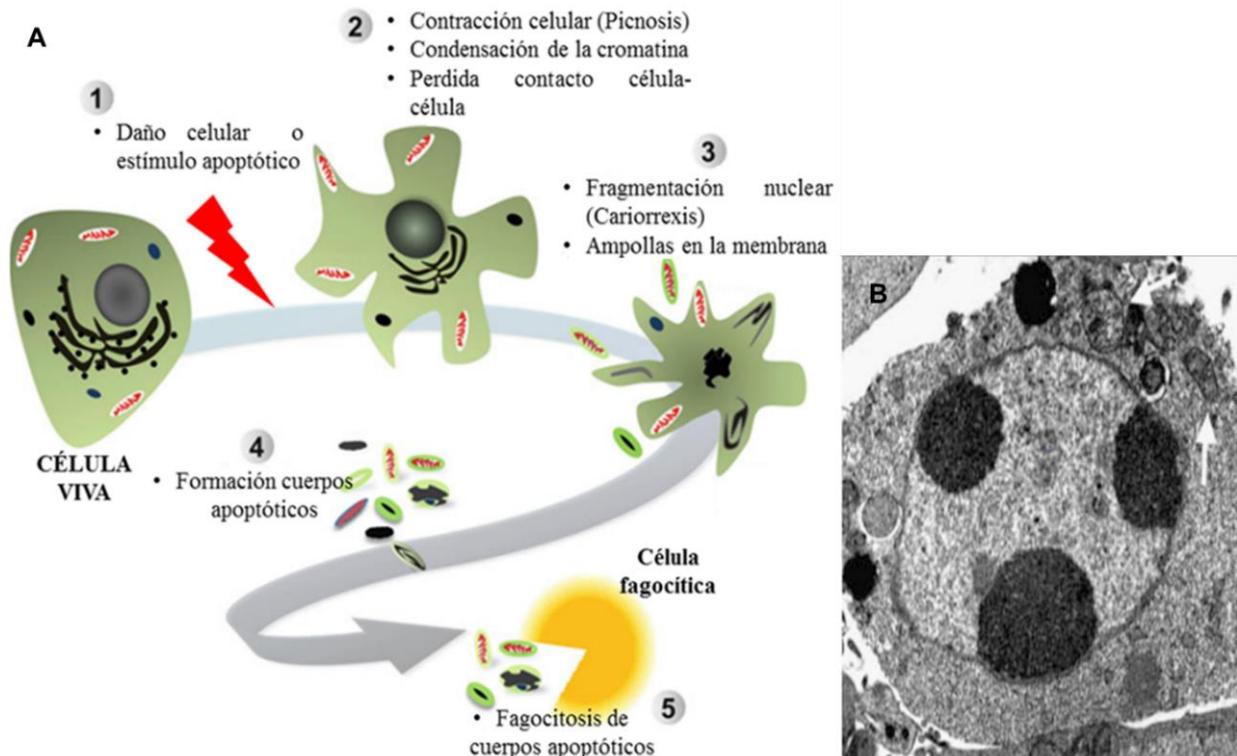
Adaptado de Julian y Olson (2015)

Entre las características morfológicas del proceso apoptótico se encuentran (figura 5): (2) la contracción celular (picnosis) en donde el citoplasma se condensa, los orgánulos se comprimen, la cromatina se aglomera, se pierde el contacto célula-célula, (3) se producen ampollas en la membrana celular, además, se presenta una fragmentación nuclear (cariorraxis) y celular, (4) formando las vesículas endocíticas que contienen material nuclear, las cuales se fusionan con la membrana plasmática, sin afectar su integridad, dando como resultado la formación de los cuerpos apoptóticos, (5) que son eliminados con rapidez por células fagocíticas, siendo un proceso tan eficaz que no se produce respuesta inflamatoria (Kerr et al. 1972; Majno y

Joris, 1995; Hirsch et al. 1997; Saraste y Pulkki, 2000; Grimsley y Ravichandran, 2003; Elmore, 2007; Majtnerová y Roušar, 2018).

## Figura 5.

### *Morfología de células en apoptosis*



A) Secuencia de los cambios morfológicos durante el proceso de muerte celular por apoptosis B). Aspecto morfológico ultraestructural de la muerte celular por apoptosis por microscopía electrónica de transmisión en una célula epitelial humana. Se observa la aglomeración de la cromatina y alteración de la integridad de las mitocondrias (flechas) X 4000.

Adaptado de Singh y Bose, (2015) y Kroemer et al. (2009)

### 2.5.1 Vía extrínseca

La vía extrínseca (figura 6), se inicia por la activación de receptores de muerte transmembrana de la familia del TNF (Factor de necrosis tumoral) (Locksley et al. 2001). Estos receptores de muerte comparten un dominio extracelular rico en cisteína y un dominio

citoplásmático de aproximadamente 80 aminoácidos designado “dominio de muerte”, este dominio juega un papel importante en la transmisión de la señal desde la superficie celular a las vías de señalización intracelular (Ashkenazi y Dixit, 1998).

La activación del receptor de muerte (Fas, TNFR1, TRAILR1) se inicia a través de la unión de ligandos específicos (FasL, TNF $\alpha$ , TRAIL). La unión del ligando al receptor, resulta en el reclutamiento de una serie de proteínas citoplasmáticas que se unen al dominio de muerte intracelular del receptor. Una de las proteínas reclutadas es la proteína adaptadora FADD, que puede interactuar directamente con el receptor o indirectamente, a través de otra proteína denominada TRADD. (1) La interacción de los receptores de muerte y sus proteínas asociadas como FADD que contiene otro dominio que interacciona con la pro-caspasa 8, y forman un complejo intracelular multiproteico denominado DISC, de esta manera (2) DISC promueve la activación autocatalítica de la caspasa 8. (3) Posteriormente, la caspasa 8 se libera del DISC y activa las caspasas efectoras como la caspasa 3, cuya acción sobre sustratos específicos conduce a la fase ejecutora de la apoptosis (figura 6). (Hsu et al. 1995; Kischkel et al. 1995; Wajant, 2002; D’Arcy, 2019).

### **2.5.2 Vía intrínseca o mitocondrial**

La vía intrínseca (figura 6), se caracteriza por eventos mitocondriales que inician la apoptosis, los cuales implican una gran variedad de estímulos no mediados por el receptor y que producen señales intracelulares, tales como la ausencia de ciertos factores de crecimiento, hormonas, citoquinas, radiación, toxinas, hipoxia, estrés celular, daño en el ADN, infecciones virales, y radicales libres (Elmore, 2007). Todos estos estímulos inducen señales apoptóticas a través de la familia de proteínas Bcl-2, que comprende miembros proapoptóticos y

antiapoptóticos (Obeng, 2020), que regulan la apertura de poros, conduciendo a la permeabilización de la membrana externa y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial (Saelens et al. 2004). Las proteínas anti-apoptóticas incluyen a Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-XS y Bcl-w, y las proteínas pro-apoptóticas a Bax, Bak, Bad, Bid, Bim, y Blk (Strasser, 2005).

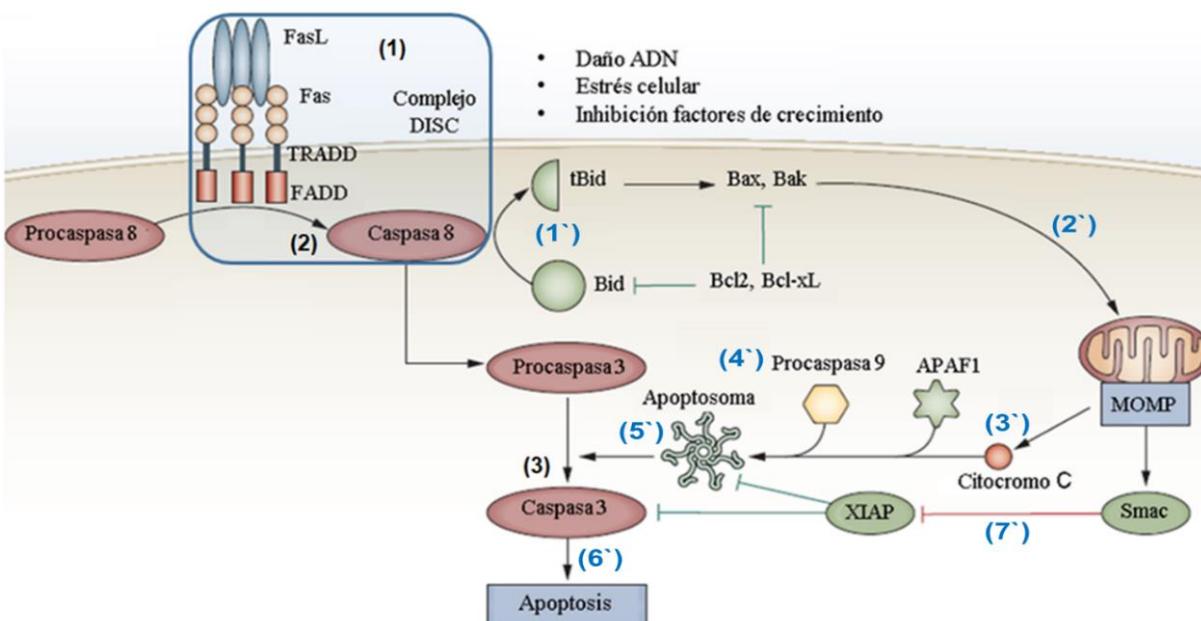
La proteína pro-apoptótica Bid (1`), es escindida por la caspasa 8 activa, permitiendo que la parte C-terminal de Bid, denominada Bid truncada (tBid), se transloque a la membrana externa de la mitocondria y active a la proteína pro-apoptótica Bax, responsable de la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) (Gross et al.1999). Bax queda libre y forma homodímeros cuando Bcl-2 se fosforila o se une con Bad. Estos homodímeros se traslocan a la mitocondria y alteran su función (2`) (Cook y Poole-Wilson, 1999), induciendo la liberación de las proteínas que se localizan en el espacio intermembrana, al citosol, tal como el citocromo C (Elmore, 2007). Una vez el citocromo C está en el citosol (3`), se une a la proteína APAF-1 que recluta y activa a la procaspasa 9, formando el apoptosoma (4`). La caspasa 9 del apoptosoma recluta y activa la caspasa 3 (5`) (Kroemer et al. 2007; Hassan et al. 2014). La caspasa 3 efectora actúa en sustratos específicos produciendo los cambios morfológicos y bioquímicos de la apoptosis (Chinnaiyan, 1999). En consecuencia, (6`) las otras proteínas liberadas al citosol como Smac/DIABLO y HtrA2/Omi, facilitan la activación de caspasas mediante la interrupción de la actividad de inhibidores como el IAPs (XIAP) (7`) (Du et al. 2000; Van Loo et al. 2002; Schimmer, 2004; D'Arcy, 2019).

Por otro lado, la activación de p53 por daño en el ADN también induce la apoptosis, ya que activa la transcripción de genes que codifican a las proteínas Puma y Noxa de la familia proapoptóticas, el aumento de la expresión de estas proteínas conduce a la activación de Bax y

Bak, la liberación del citocromo C y la activación de la caspasa 9 (Schuler y Green, 2001; Oren, 2003; Vousden y Lane, 2007; Hong et al., 2019).

## Figura 6.

### Vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis



APAF1, Factor activador de proteasa 1; DISC, Complejo de señalización inductor de la muerte; FADD, Proteína con dominio de muerte asociada a Fas; FasL, Ligando Fas; MOMP, Permeabilidad de la membrana mitocondrial externa; Smac, Segundo activador de caspasas derivado de mitocondria; TRAIL, Ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral; TNFR1, Receptor 1 del factor de necrosis tumoral; XIAP, Inhibidor de la apoptosis ligado al cromosoma X.

Adaptado de Ramaswamy et al. (2011).

### 2.5.3 Vía del retículo endoplasmático intrínseco

En condiciones de estrés del retículo endoplasmático (RE), cuando se altera la función y se da la acumulación de proteínas mal plegadas, se activa una vía de transducción de señales de respuesta de proteína mal plegada (UPR) (figura 7). La UPR detiene la síntesis de proteínas en general y activa las vías de señalización que incrementan la producción de chaperonas

involucradas en el plegamiento de las proteínas (Travers *et al.* 2000), permitiéndole a la célula, corregir el entorno dentro del RE (Patil y Walter, 2001). Sin embargo, si el daño es demasiado fuerte y no se puede restaurar la homeostasis, la UPR activa tres proteínas transmembrana del RE que actúan como sensores, ATF6 ("Activating transcription factor-6"), IRE1 $\alpha$  ("Inositol-requiring protein-1") y PERK ("Protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase"), que inician la cascada de señalización apoptótica (Patil y Walter, 2001; Breckenridge *et al.* 2003).

Normalmente estas tres proteínas transmembrana se encuentran inactivas a través de una asociación entre sus dominios luminales N-terminales y la chaperona BiP (proteína de unión a inmunoglobulina) que está presente en el RE en estados monoméricos y oligoméricos (Blond-Elguindi *et al.* 1993). Bajo condiciones de estrés, BiP se disocia para unirse a las proteínas mal plegadas. Esto conduce a la fosforilación y dimerización parcial de IRE1 $\alpha$  y PERK (Breckenridge *et al.* 2003).

La primera molécula clave para la apoptosis mediada por estrés del RE es la proteína homóloga C/EBP (CHOP). (1) La activación de PERK induce la fosforilación de EIF2, que activa ATF4, que posteriormente determina la regulación positiva del factor proapoptótico CHOP; su expresión aumenta también por ATF6 (Pereira, 2013; Martucciello *et al.* 2020).

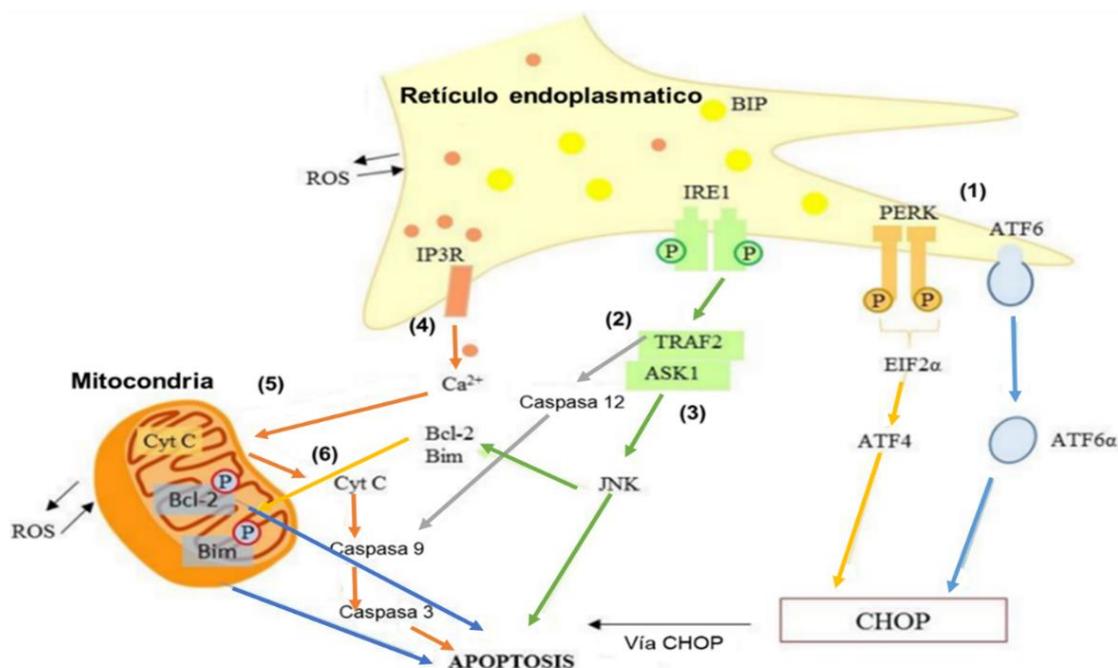
Además, la señalización a través de la rama (2) IRE1 de la UPR, puede inducir la apoptosis en condiciones de estrés del RE debido a la asociación de IRE1 $\alpha$  con el factor 2 asociado al receptor de TNF (TRAF2), que desencadena la activación de la caspasa-12, induciendo la cascada de caspasas. El complejo IRE1 $\alpha$ -TRAF2, (3) activa la señal de apoptosis que regula la quinasa 1 (ASK1), que a su vez mejora la actividad proapoptótica de los miembros de la familia Bcl2, a través de la señalización de la quinasa del extremo N-terminal de c-Jun

(JNK) (Breckenridge et al. 2003; Xu et al. 2005; Pereira, 2013; Hu et al. 2019; Martucciello et al. 2020).

En la vía apoptótica dependiente de la mitocondria, (4) se liberan las reservas intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE a través de los receptores de rianodina (RyR), en particular; por el receptor del inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R). (5) Una fracción significativa del  $\text{Ca}^{2+}$  liberado es capturado por las mitocondrias, que se encuentran cerca de los canales de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y conducen a la activación de un vía de muerte celular apoptótica mediada por mitocondrias (Rizzuto et al. 1998) (Pereira, 2013). (6) El  $\text{Ca}^{2+}$  liberado a su vez, desencadena la liberación coordinada del citocromo C de todas las mitocondrias y, por lo tanto, se amplifica la señal apoptótica (Wang<sup>b</sup> y El-Deiry, 2004; Iurlaro y Muñoz, 2016).

### Figura 7.

#### *Vía apoptótica del retículo endoplasmático*



ATF6, factor activador de la transcripción 6; IRE1α; Proteína-1 que requiere inositol; JNK: Quinasa del dominio N-

terminal de c-Jun; PERK, proteína quinasa del RE activada por ARN de doble cadena; CHOP, proteína homóloga C/EBP; EIF2, factor de iniciación eucariota 2; ATF4, Factor activador de la transcripción 4; ATF6, Factor activador de la transcripción 6; ASK1, quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis; TRAF2, factor 2 asociado al receptor de TNF; JNK, quinasa del extremo N-terminal de c-Jun; IP3R, receptor del inositol-1,4,5-trifosfato.

Adaptado de Martucciello et al. (2020).

En estudios realizados en la línea celular GC spg1 (espermatogonia) expuesta a diferentes dosis (0–100  $\mu\text{M}$ ), se evidenció que ZEA aumentó la expresión de proteínas clave implicadas en el proceso apoptótico, como la caspasa-3, caspasa-8, BAD, BAX, y ERK1/2 (Lee et al. 2022). Resultados similares obtenidos por Lee et al. (2021), se demostró que ZEA induce la apoptosis de células endoteliales bovinas de aorta (BAEC), a través de un mecanismo que es independiente del receptor de estrógeno y ROS, pero está estrechamente asociado con los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$  y la posterior activación de un eje de señalización ERK1/2/p53/caspasa 3. Se ha informado también que ZEA aumenta el nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico al inducir estrés del ER en células TM4 (Feng et al. 2020).

## 2.6 Necrosis

La necrosis, es un proceso no regulado de muerte celular, como resultado de un daño severo en la célula. Se caracteriza por el agotamiento de ATP, hinchazón celular, lisis, y liberación del contenido intracelular y moléculas proinflamatorias. Las células que mueren por necrosis con frecuencia exhiben cambios en la morfología nuclear, en donde la condensación de la cromatina se da de manera irregular y la fragmentación del ADN se presenta de forma escalonada o al azar, generándose fragmentos de diferentes tamaños (figura 8A) (Eguchi et al. 1997; Edinger y Thompson, 2004).

Cabe señalar que, los principales eventos de la necrosis son la insuficiencia bioenergética y la rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática, debido a la producción excesiva de ROS mitocondrial que conduce al estrés oxidativo, causando la escisión de las cadenas de

ADN y la oxidación de las purina (figuras 8C y 8D) (Marnett, 2000; Zong y Thompson, 2006). Además, la inhibición de la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial, por la reducción de los niveles de ATP, el daño a lípidos de membrana, y la pérdida de la función de los canales y bombas de iones que mantiene la homeostasis, conlleva a una rápida pérdida del potencial de membrana celular. La incapacidad para mantener estos potenciales electroquímicos resulta en la hinchazón citoplasmática, la rotura de la membrana plasmática, y la citólisis. Estos defectos pueden actuar sinérgicamente en la inducción de la muerte celular necrótica (Hartley et al. 1994; Zong y Thompson, 2006).

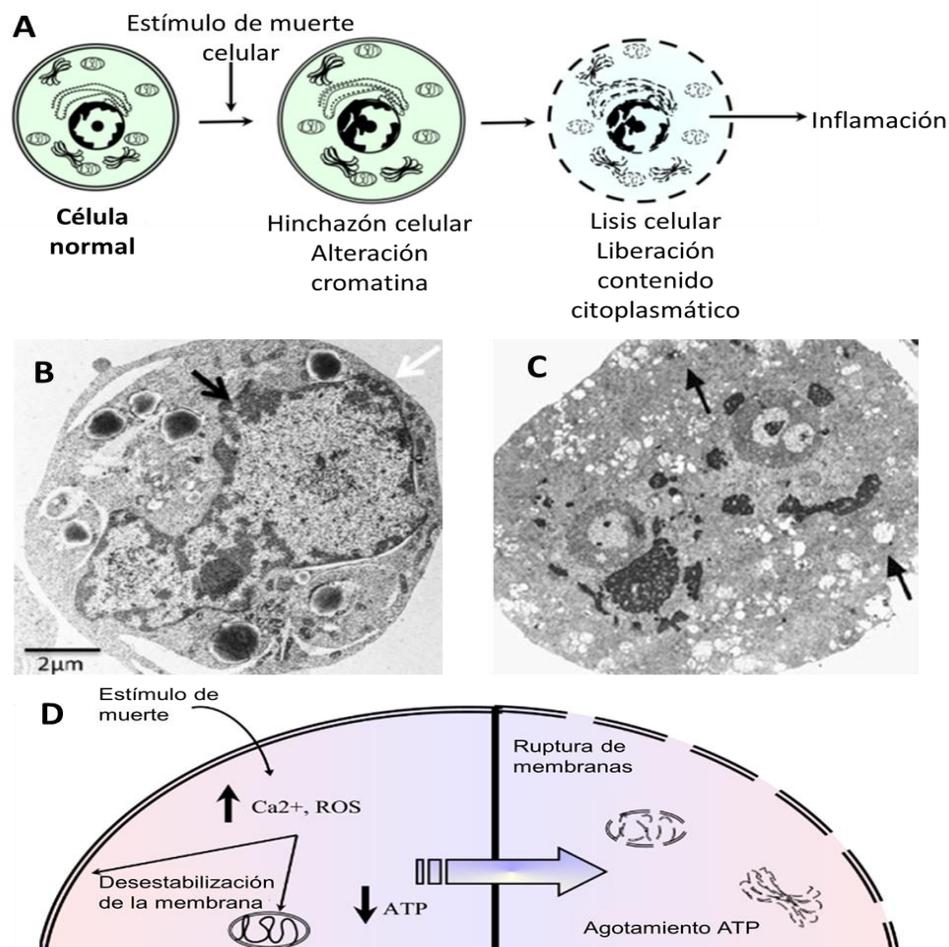
No obstante, alteraciones en el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  puede causar citotoxicidad, por ejemplo, el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico también puede desencadenar la muerte celular, ya sea la apoptosis o necrosis. El resultado de la muerte celular está probablemente determinado por la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Considerando que a baja o moderada concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (2-400 nM) desencadena la apoptosis, y a mayor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  (> 1 M) causa necrosis (figura 8D) (McConkey y Orrenius, 1997; Orrenius et al. 2003).

Así mismo, existen proteasas implicadas en la necrosis, como son las calpaínas y catepsinas principalmente. Las calpaínas son una familia de cisteína proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , que residen en el citosol como una forma inactiva, pero que en respuesta al aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, se translocan a las membranas intracelulares y se activan por la hidrólisis autocatalítica (Rami, 2003). Por otro lado, el  $\text{Ca}^{2+}$  también puede contribuir a la activación de las catepsinas causando permeabilidad de la membrana lisosomal, que puede conducir a la liberación de enzimas lisosómicas y la muerte celular necrótica (Yamashima, 2004).

En una célula sana, las catepsinas residen en los lisosomas y ayudan a descomponer las moléculas fagocitadas que son recicladas para la biosíntesis de novo. Las catepsinas son completamente activas en el ambiente ácido de los lisosomas, pero cuando la membrana lisosomal pierde su integridad, las catepsinas se liberan al exterior de los lisosomas y digieren moléculas que normalmente no están expuestas a estas proteasas, ocasionando necrosis (Zong y Thompson, 2006; Rawlings et al. 2010).

### Figura 8.

*Eventos morfológicos y bioquímicos de la muerte celular por necrosis*



**A)** Secuencia de los cambios morfológicos durante el proceso de muerte celular por necrosis. **B)** Célula Jurkat con una morfología normal, con membrana celular intacta (flecha blanca) y membrana nuclear (flecha negra). **C)**

Aspecto morfológico ultraestructural de la muerte celular por necrosis por microscopía electrónica de transmisión en una célula epitelial humana. Se observa rotura de la membrana, hinchazón de vesículas intracelulares y pérdida de la estructura mitocondrial (flechas) X 4000. **D)** Cambios bioquímicos durante la muerte celular por necrosis Adaptado de (Kroemer et al. 2005; Escobar et al. 2015).

## **2.7 Muerte celular apoptótica y/ o Necrótica inducida por micotoxinas**

La inducción de la apoptosis por micotoxinas como aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxina, zearalenona, deoxivalenol, entre otras, se relaciona con la activación de múltiples caspasas, tales como la caspasa efectora 3, la caspasa 8 (vía ligando-receptor), la caspasa 9 (vía mitocondrial) y las caspasas 12 y 14 (vía retículo endoplasmático). Así mismo, se sugiere que la activación de la vía mitocondrial (vía intrínseca) con la interrupción del potencial de membrana mitocondrial (MMP) desempeña un papel importante en la apoptosis dependiente de caspasas inducida por micotoxinas. El MMP está controlado por las proteínas de la familia Bcl-2, incluidas las proteínas pro-apoptóticas Bax, Bak, Bok, Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, etc, y proteínas anti-apoptóticas como Bcl2, Bcl-xL, Bcl-w, A1, Mcl-1, etc., y el equilibrio entre las proteínas pro-apoptóticas y anti-apoptóticas es esencial para mantener el potencial de la membrana mitocondrial a niveles normales (Yin et al. 2018).

Cabe destacar que, las micotoxinas regulan positivamente las proteínas pro-apoptóticas y/o disminuyen las proteínas anti-apoptóticas, conduciendo al desequilibrio de las proteínas pro-apoptóticas y antiapoptóticas de la familia Bcl-2, seguido por la pérdida de MMP, la liberación de citocromo C de las mitocondrias, la formación del apoptosoma y, en consecuencia, la apoptosis mediada por caspasas, así como también, la activación de vías de señalización con la participación de p53, MAPKs, estrés del retículo endoplasmático y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Banjerdpongchai et al. 2010; Bouaziz et al. 2011; Peng et al. 2016; Hu et al. 2016; Jin et al. 2016; Yin et al. 2018).

Por ejemplo, se reporta que la apoptosis de células HL-60 y U937 inducida por ZEA es mediante la activación de la liberación mitocondrial del citocromo C a través de la reducción del MMP, la activación de caspasa-3 y -8, la producción de ROS y la inducción del estrés del retículo endoplásmico, además, se evidencian diferencias en los niveles de 22 proteínas de membrana entre las que se destacan el factor inductor de apoptosis, las proteínas de estrés del retículo endoplasmático (ERp29) y calreticulina (Banjerdpongchai et al. 2010; Yin et al. 2018).

De igual manera, se obtuvo muerte celular inducida después del tratamiento con 50  $\mu$ M de ZEA durante 24 h, en macrófagos RAW264.7, principalmente a través de necrosis en lugar de apoptosis, según los análisis obtenidos por citometría de flujo después de la tinción con anexina V-FITC/IP, los cuales revelaron que la población celular presentó un porcentaje de captación de IP de 28% en comparación con el control (35%), y de anexina V-FITC del 6.9% en comparación con el control (3.4%) (Yu et al. 2011).

Por otro lado, en células germinales de ratas expuestas a ZEA, se induce la apoptosis modulada por Fas y FasL (Jee et al. 2010). Mientras que DON induce la expresión de caspasas-3-7-8, y se evidencia alteración en la morfología mitocondrial, pero no se aumenta las ROS intracelulares (Peng et al. 2016; Springler et al. 2017).

Finalmente, el tratamiento con dosis bajas de Fusarenon X, miembro del grupo de las micotoxinas de los Tricotecenos, puede inducir la apoptosis en linfocitos a través de un efecto sobre Bax, Bid, y caspasa 9 a través de la vía apoptótica mitocondrial (Aupanun et al. 2016). En estudios realizados por Osuchowski y Sharma (2005) se demostró que la exposición a 50  $\mu$ M de Fumonisina B (FB1) durante 8 días, provoca muerte celular necrótica pero no apoptótica tanto en la línea celular BV-2 microglial murina como en los astrocitos primarios.

## 2.8 Efectos citotóxicos inducidos por ZEA

La línea celular HepG<sub>2</sub> se ha empleado como modelo para estudios *in vitro* debido a que tienen muchas de las propiedades de las células hepáticas primarias, incluyendo la activación metabólica y constituyen un sistema de destino para la toxicidad de ZEA (Lu y Huang, 1994; Gazzah et al. 2013). Así mismo, ZEA se absorbe rápidamente después de la exposición oral (Pfeiffer et al. 2011) y se metaboliza a sus análogos reducidos ( $\alpha$ -zearalenol y  $\beta$ -zearalenol), principalmente a través del metabolismo hepático (Tatay et al. 2017; Rai et al. 2020). También, se ha demostrado que activa la peroxidación lipídica, y es inmunotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica y genotóxica (Pistol et al. 2014).

En los últimos años, se han reportado varios mecanismos posibles para la toxicidad de ZEA, en los cuales induce efectos intracelulares severos (figura 9).

ZEA y sus metabolitos pueden estimular la proliferación celular por la afinidad de unión a receptores de estrógeno (RE) (Rogowska et al. 2019), debido a su similitud estructural con 17 $\beta$ -estradiol (E2) (Adibnia et al. 2016). Estos receptores pueden activar vías de señalización celular dependiente de enzimas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) y las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2) (Kunishige et al. 2017). Las proteínas ERK generalmente se encuentran en el citoplasma; tras la activación, ERK ingresan al núcleo y regulan la actividad del factor de transcripción y la expresión génica (Yue y López, 2020).

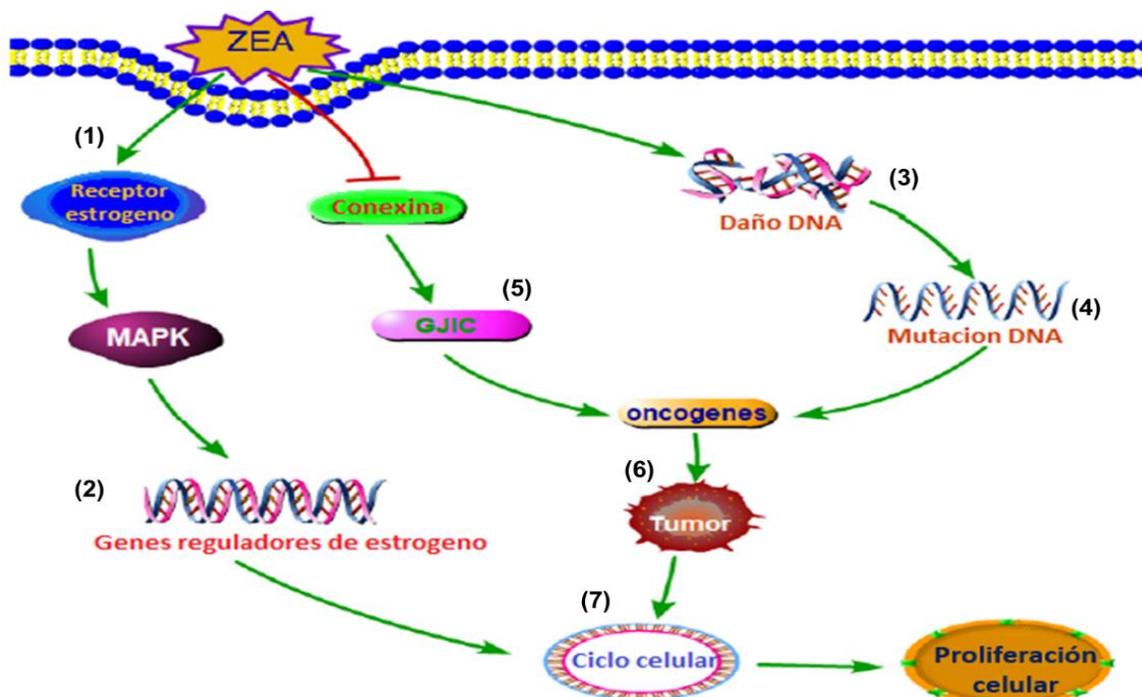
Estudios indican que ZEA, (1) cruza la membrana celular y se une a los receptores formando un complejo, el cual es transportado al núcleo, en donde interactúa con elementos de respuesta a estrógenos (ERE) para unirse al ADN, (2) desencadenando la transcripción de genes diana y la síntesis de proteínas (Mayr et al. 1992; McDonnell et al. 2002; Knutsen et al. 2017; Yang et al. 2018). Además, se ha sugerido que una dosis baja de ZEA ( $1 \times 10^{-4}$   $\mu$ M a un máximo

de  $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ ) promueve la proliferación celular, atribuyéndose a sus efectos similares al estrógeno y propiedades cancerígenas, debido a que puede (3) causar fragmentación del ADN y aberraciones cromosómicas (Kowalska et al. 2017; Lecomte et al. 2017; Makowska et al. 2017; Zheng<sup>a</sup> et al. 2018). De modo que, sí el daño en el ADN se repara mediante reparación SOS, (4) es posible que se produzcan mutaciones, lo que puede conducir aún más a la proliferación celular (Liu et al. 2017).

De igual manera, estudios han revelado que ZEA podría (5) inhibir la comunicación intercelular de la unión gap (GJIC), promoviendo la expresión de oncogenes y destruyendo el equilibrio dinámico entre el crecimiento y la muerte celular (Ouanes-Ben Othmen et al. 2008; Zheng<sup>a</sup> et al. 2018). Por lo tanto, (6) la disfunción de GJIC generalmente se considera un precursor para el desarrollo de tumores (Mesnil et al. 2005). Adicionalmente, (7) ZEA puede inducir la progresión del ciclo celular debido a la disminución de las células en fase G0/G1 y aumento de células en fase S, en las células MCF-7 del cáncer de mama (Darbre et al. 2002; Yu et al. 2005).

**Figura 9.**

*ZEA y sus derivados pueden ejercer efectos similares al estrógeno que pueden estimular la proliferación celular*



Zearalenona (ZEA); Proteína quinasa activada por AMP (AMPK); comunicación intercelular de la unión gap (GJIC)  
Adaptado de Zheng<sup>a</sup> et al. (2018)

Se ha evidenciado también que ZEA y sus derivados no solo pueden estimular el crecimiento celular, sino también inhiben la viabilidad celular (Kowalska et al. 2017; Makowska et al. 2017). Tal como se ha reportado en diferentes estudios, ZEA induce la muerte celular al alterar la distribución del ciclo celular y la expresión de las proteínas reguladoras, causando la detención en la fase G2/M, disminuyendo el número de células en G0/G1 y S; y aumentando el número de células en la fase G2/M (Abid-Essefi et al. 2003; Sang et al. 2016; Zhang<sup>b</sup> et al. 2018; Zheng<sup>a</sup> et al. 2018). Otros estudios indicaron que la razón por la cual se detiene en G0/G1 o G2/M es para reparar el daño del ADN, provocando el retraso de la replicación y, en

consecuencia, la inhibición de la proliferación celular (Tobey, 1975; Abid-Essefi et al. 2004; Wang et al. 2019).

Así mismo, ZEA también puede afectar la expresión de proteínas reguladoras, incluidas Cyclin-B1, CyclinD1, CDK2 y CDK4, afectando la distribución del ciclo celular, causando la disminución de la viabilidad celular (Zheng<sup>b</sup> et al. 2018). Además, en un estudio realizado por Vlata et al. (2006), se encontró que la concentración de 30 µg/ml de ZEA inhibe la proliferación de linfocitos T y B y causa altas tasas de muerte celular. Adicionalmente, ZEA con valores de  $CI_{50}$  de 3,5 y 30 µg/mL inhibe la blastogénesis de linfocitos (Charoenpornsook et al. 1998). Por otra parte, estudios realizados por Zheng et al. (2016) en las células de Sertoli, observaron que la viabilidad se redujo notablemente después del tratamiento con ZEA (15-60 µM) durante 24 horas. Otros estudios demuestran que cuando las células HepG<sub>2</sub> se expusieron a 100 µM de ZEA a diferentes tiempos (2, 4, 8, 24, 30, 48 y 60 horas), se inhibió la viabilidad celular en una forma dependiente del tiempo y ocasionó el 90% de muerte celular después de 60 horas de tratamiento (Gazzah et al. 2010).

## 2.9 Apoptosis inducida por ZEA

Se ha registrado que ZEA induce la apoptosis celular a través de vías de señalización del estrés del RE y mitocondrial. Sin embargo, la acumulación de especies reactivas del oxígeno (ROS) puede causar estrés oxidativo, conduciendo también, a la muerte celular por apoptosis (figura 10) (Yang et al. 2007; Tatay et al. 2016; Zheng<sup>b</sup> et al. 2018).

Se ha informado que ZEA durante la formación de sus metabolitos ( $\alpha$ -ZEL y  $\beta$ -ZEL) y derivados, (1) provoca un aumento en los niveles de estrés oxidativo y ROS, por lo tanto, parece ser un determinante clave de la toxicidad inducida por ZEA *in vivo* e *in vitro*, causando daño en

el ADN (Tatay et al. 2016-2017; Yu et al. 2017; Rajendran et al. 2021). Inclusive, el daño oxidativo causado durante el metabolismo de ZEA, se atribuye a los complejos mitocondriales adicionales, estimulando el aumento gradual de superóxido dismutasa (SOD) y malondialdehído (MDA) de forma dosis dependiente (So et al. 2014; Zheng<sup>a</sup> et al. 2018). En estudios realizados por El Golli et al. (2009) se reportó una mayor producción de ROS en células HepG<sub>2</sub> expuestas a 100 µM de ZEA. Adicionalmente, la generación de ROS está relacionada con la vía del estrés del RE (Cao y Kaufman, 2014; Hu et al. 2019).

La inducción por la vía del estrés del RE, es debido a la activación de moléculas proapoptóticas, (2) tal como la chaperona molecular específica GRP78, también conocida como Bip, y el factor de transcripción apoptótico CHOP. Estudios indican que BiP y CHOP se regulaban positivamente después del tratamiento con ZEA de una manera dependiente del tiempo y la dosis (Chen et al. 2015-2016; Iurlaro y Muñoz, 2016; Zheng<sup>a</sup> et al. 2018). La proteína CHOP contribuye a este proceso al inhibir la expresión de Bcl2 antiapoptótico (Kamp et al. 2013).

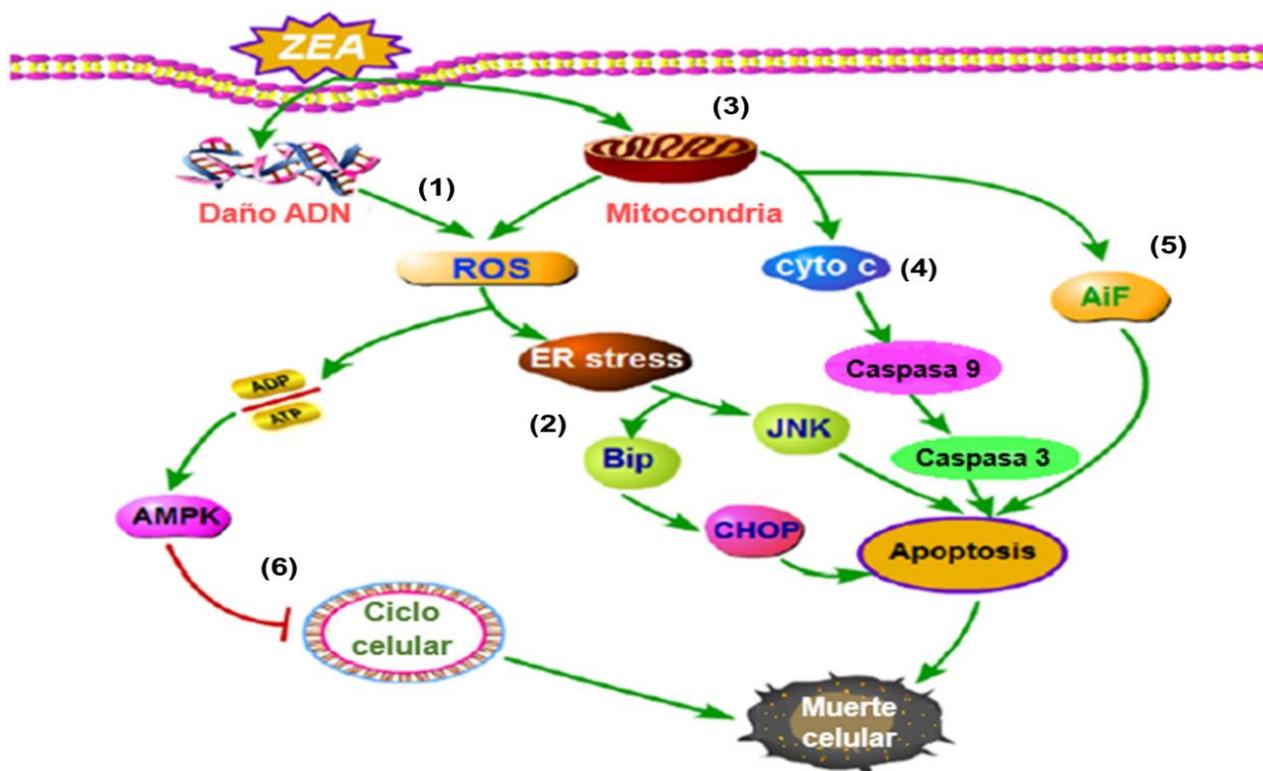
La mitocondria es la principal fuente de ROS intracelular (3); y se sugiere que ZEA altera su estructura causando daños más graves después del tratamiento con diferentes concentraciones, induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial que conlleva a la reducción significativa del potencial de membrana y la inactivación de la citocromo C oxidasa de manera dosis dependiente (Zheng et al. 2016; Zheng<sup>b</sup> et al. 2018, Hu et al. 2019). Estudios indican que ZEA causó la muerte celular por apoptosis y necrosis en células RAW264.7, con pérdida del potencial de la membrana mitocondrial (MMP), cambios mitocondriales en las proteínas Bcl-2 y Bax, (4) liberación citoplasmática del citocromo C y del (5) factor inductor de apoptosis (AIF)(Yu et al. 2011).

Por otra parte, varios estudios han indicado que ZEA (6) altera el porcentaje de distribución celular en diferentes células (Zheng<sup>a</sup> et al. 2018, Abid-Essefi et al. 2003), tal como lo indica un estudio en células MTEC1, en el cual se evidenció que ZEA afectó significativamente la distribución del ciclo celular y provocó su detención en la fase G2/M, después del tratamiento *in vitro* durante 24 horas y 48 horas. Se ha informado también que ZEA no solo altera el ciclo celular, sino que también afecta la expresión de las proteínas reguladoras incluidas Cyclin-B1, CyclinD1, CDK2 y CDK4 de manera dependiente de la dosis, a través de la vía del estrés del ER, generación de ROS y la vía ATP/AMPK, en células de Sertoli de ratón (Zheng<sup>b</sup> et al. 2018). Estudios en células de Leydig porcinas expuestas a una CI<sub>50</sub> de ZEA 49,71  $\mu$ M, evidenciaron un aumento de la apoptosis celular, así como una alteración del potencial de membrana de las mitocondrias y la distribución del ciclo celular (Sun et al. 2022).

Además, de las vías mencionadas anteriormente, también se encontró que la vía intrínseca iniciada por la vía mitocondrial dependiente de p53, es un proceso de apoptosis inducida por ZEA (Banjerdpongchai et al. 2010). El factor de transcripción p53 puede reprimir o activar las expresiones de múltiples genes. La activación de la vía dependiente de p53 puede conducir a cambios apoptóticos mitocondriales, como la liberación del citocromo C y la activación de la cascada de caspasas a través de formas de señales extrínsecas e intrínsecas para desencadenar la muerte celular (Wang<sup>a</sup> et al. 2014; Chen et al. 2019). En esta vía, ZEA también podría afectar las expresiones de las proteínas de la familia Bcl-2, incluida la regulación positiva de Bax y la regulación negativa de la expresión de Bcl-2 (Xu et al. 2016). En algunos reportes, se estableció que ZEA a concentraciones de 20 a 80  $\mu$ M, induce apoptosis en las células HepG<sub>2</sub> y BAEC a través de la vía mitocondrial dependiente de p53 (Norbury y Zhivotovsky, 2004; Ayed-Boussema et al. 2008; Lee et al. 2021).

Figura 10.

Mecanismos moleculares de la muerte celular inducida por ZEA



Zearalenona (ZEA); especies reactivas de oxígeno (ROS); Proteína quinasa activada por AMP (AMPK); estrés del retículo endoplásmico (RE); Unión de proteína inmunoglobulina (BiP); quinasa c-Jun amino terminal (JNK); Proteína homóloga C / EBP (CHOP); citocromo C (cito C); factor inductor de apoptosis (AiF).

Adaptado de Zheng<sup>a</sup> et al. (2018)

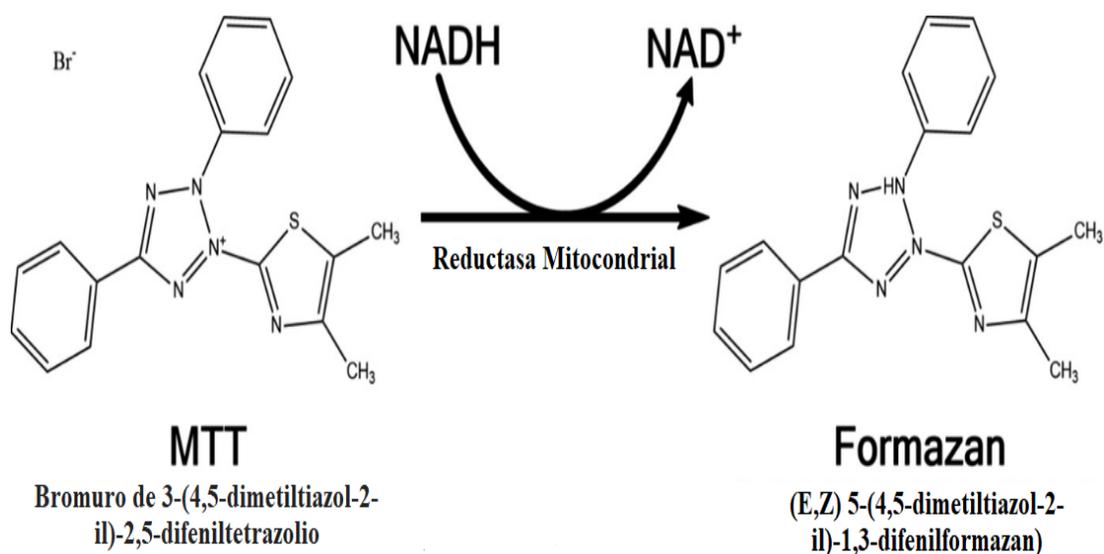
## 2.10 Proliferación celular por el ensayo de MTT

El ensayo de reducción MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es utilizado para determinar los niveles de actividad metabólica en células eucariotas. La determinación se basa en la reducción metabólica del MTT, por medio de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa permitiendo determinar de esta manera la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas (Verhulst et al. 1998; Niles et al. 2008; Liu y Nair, 2010). Las coenzimas reducidas resultantes (NADH y NADPH) convertirán el MTT en formazan, un compuesto de color violeta (figura 11). La cantidad de formazan producido es proporcional a la cantidad de

células metabólicamente activas (Mosmann, 1983). El formazan es un precipitado insoluble dentro de las células, y se deposita cerca de la superficie celular, por lo cual debe ser solubilizado antes de realizar la lectura de la placa, bien sea con isopropanol- HCl, dimetilsulfóxido (DMSO) o dodecilsulfato sódico (SDS). El producto solubilizado se mide a una longitud de onda entre 570 y 590 nm por espectrofotometría (Riss et al. 2016).

### Figura 11.

*Ensayo MTT para la viabilidad celular. Reducción del MTT a formazán*



Adaptado de Kamiloglu et al. (2020)

Estudios indican que por medio del ensayo MTT es posible evaluar la citotoxicidad de ZEA en diferentes tipos de células. Zheng et al. (2016), determinaron la  $CI_{50}$  con valores entre 20-40  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 horas de tratamiento, en las células de Sertoli, obteniendo porcentajes de inhibición en un rango de 40% y 52,65% respectivamente. A su vez, Hassen et al. (2005), reportaron que ZEA disminuyó la proliferación de las células HepG<sub>2</sub> de manera dependiente de

la dosis (CI<sub>50</sub> 95  $\mu$ M), después de 24 horas de exposición a concentraciones de 100  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, con porcentajes de 48% y 11%, respectivamente.

Otros reportes obtenidos por Lee et al. (2013), demuestran que ZEA tuvo un mayor efecto citotóxico en las células HepG2 en comparación con línea celular hígado de Chang, ya que la viabilidad celular fue reducida al 50,4% y 54,2% con respecto a los controles para cada línea, después del tratamiento con 150  $\mu$ M ZEN, respectivamente.

### 2.11 Detección de eventos bioquímicos, moleculares y morfológicos de la apoptosis

La muerte celular por apoptosis implica una serie de modificaciones bioquímicas y morfológicas que pueden ser identificadas por medio de ensayos, que evalúan aspectos individuales con la ayuda de marcadores específicos, permitiendo la cuantificación de las células en etapa tardía o temprana (Plenchette et al. 2004), como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Marcadores para la detección de la etapa temprana y tardía de la apoptosis

Etapa de la apoptosis	Marcador de apoptosis	Método de detección
<b>Temprana</b>	Externalización de la fosfatidil-serina	Anexina V y análisis FACS
	Activación de caspasas	Ensayos enzimáticos/ <i>Western blot</i>
	Escisión de sustratos de caspasa	<i>Western blot</i> para sustratos escindidos: PARP
	Alteraciones mitocondriales (Pérdida del potencial de membrana)	Tinción con DIOC6
<b>Tardía</b>	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-Wilson (1999); Majtnerová y Roušar, (2018)

Sin embargo, un cambio importante de la membrana en los eventos tempranos en la apoptosis, implica la inversión de fosfolípidos aniónicos y grupos de fosfatidilserina a la superficie exterior de la membrana, para que las células vecinas los reconozcan. En efecto, la detección *in vitro* de fosfatidilserina externalizada se puede lograr a través de la interacción con el anticoagulante anexina V. La anexina V conjugada con FITC se une a la fosfatidilserina expuesta, lo que permite la detección de apoptosis; sin embargo, la tinción combinada con yoduro de propidio (PI) distingue entre células apoptóticas tempranas y tardías o en necrosis, mediante clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o citometría de flujo (Smyth y Berman, 2002). FACS es una técnica utilizada para separar moléculas específicas en poblaciones de células, en función de los fenotipos detectados por citometría de flujo. Estas células específicas se iluminan con una luz láser y muestran las características de nuestro interés (Naeem et al. 2017).

Por otra parte, la apoptosis también puede ser determinada por la activación de la cascada de proteasas de cisteína-aspártico (caspasas) que median eventos de señalización, y conducen a la activación de caspasas efectoras, involucradas en eventos proteolíticos terminales del proceso apoptótico (O'Brien et al. 2001). Entre estos eventos, se incluyen la escisión de enzimas reparadoras como la poli ADP ribosa polimerasa (PARP). PARP es una enzima nuclear que participa en la reparación de daños en el ADN y cataliza la síntesis de poli (ADP-ribosa) a sí misma y a otras proteínas nucleares, en respuesta a mellas y roturas del ADN. En células apoptóticas, la caspasa 3 escinde esta enzima (péptido de 116 kD), en polipéptidos de 89 kD y 24 kD durante la degradación del ADN celular, lo que evita la reparación del daño del ADN. Los productos de la escisión de PARP se pueden evaluar por Western blot combinado con detección

de quimioluminiscencia mejorada (ECL), siendo un marcador útil para la apoptosis temprana (Smyth y Berman, 2002; Mullen, 2004).

Así mismo, se han utilizado colorantes catiónicos para medir el potencial de la membrana mitocondrial (MMP) en células enteras (Bossy-Wetzel y Green, 2000). La reducción del MMP es uno de los cambios encontrados durante primeras etapas de la apoptosis y está precedida por la liberación del citocromo C en varios tipos de células. El yoduro de dihexiloxacarbocianina (DiOC<sub>6</sub>) es un colorante catiónico, cargado positivamente que se une a la membrana mitocondrial, cargada negativamente (Chen et al. 1998). Una disminución del MMP en las células apoptóticas, se asocia con una reducción en la absorción de DiOC<sub>6</sub>, lo cual se puede evaluar mediante citometría de flujo (Petit et al. 1995; Masson et al. 2020).

A su vez, la fragmentación del ADN se ha utilizado como un marcador específico, que proporciona evidencia de muerte celular por apoptosis. En el proceso apoptótico, las nucleasas se activan y escinden las hebras de ADN internucleosomal desprotegidas por histonas, generando fragmentos de ADN de 180 pb, que se ejecutan electroforéticamente en geles de agarosa como una escalera de ADN (Smyth y Berman, 2002). No obstante, uno de los métodos más utilizados para detectar daños en el ADN *in situ* es el ensayo de marcado de corte final de dUTP de desoxinucleotidil transferasa Terminal (TdT) (TUNEL, por sus siglas en inglés) el cual, permite detectar la fragmentación del ADN producida por la activación de cascadas durante la apoptosis. El método se basa en la capacidad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para añadir dUTPs (2'-desoxiuridina 5'-trifosfato) marcados, en los extremos 3'-OH libres, generados por la fragmentación del ADN bien sea de cadena simple o doble (Gavrieli et al. 1992; Heatwole, 1999; Darzynkiewicz et al. 2008; Majtnerová y Roušar, 2018).

Finalmente, la apoptosis tiene una serie de características morfológicas, que permiten la diferenciación entre las distintas formas de muerte celular, en las cuales incluyen el encogimiento celular y nuclear con condensación de cromatina, la pérdida de contactos entre células, la formación de ampollas en la membrana, la condensación nuclear y, finalmente, la formación de la célula en cuerpos apoptóticos que son fagocitados por las células circundantes. Estas características pueden ser observadas por medio de microscopía electrónica de transmisión para demostrar la pérdida de estructuras intracelulares, ya que se pueden obtener imágenes de ultra alta resolución de diferentes muestras (Elmore, 2007).

## **2.12 Muerte celular por citometría de flujo**

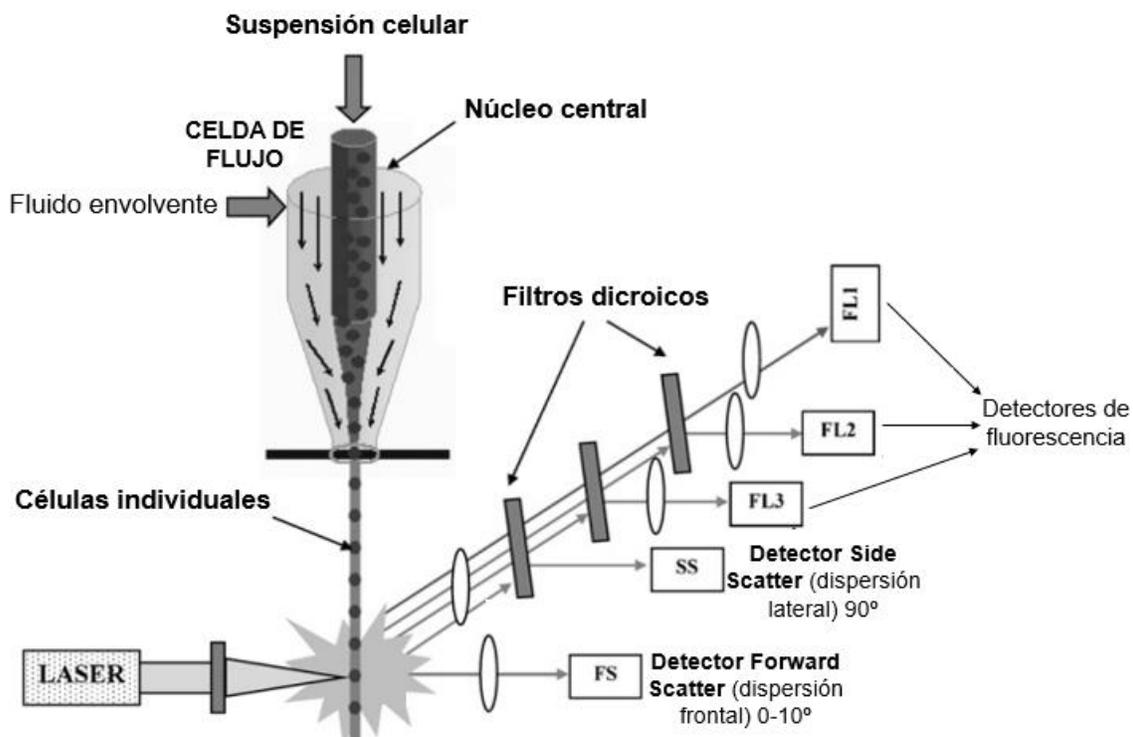
La citometría de flujo es una técnica empleada para medir, diferenciar, analizar y cuantificar las células de acuerdo a parámetros de fluorescencia y clasificación morfológica como tamaño y granularidad, brindando información sobre poblaciones celulares de manera individualizada (generalmente entre 5000 y -10000 eventos) a medida que las células en suspensión, fluyen en una corriente, a través de un haz de luz de excitación (Macey, 2007; Wilkerson, 2012; Han y Lo, 2015). Con esta técnica, es posible obtener información adicional en cuanto a funciones celulares, a partir de células teñidas con fluorocromos, los cuales, se seleccionan en función de su capacidad para emitir fluorescencia con las longitudes de onda de la luz producida por los láseres, que iluminan las células y envían las señales hacia detectores (Tuchin et al. 2011; Schmit et al. 2021).

Cuando las células son incididas por el láser, se detectan las señales y son recogidas por el sistema de detección formado por un conjunto de fotodiodos, tres detectores de fluorescencia (FL1, FL2, FL3), y dos detectores de dispersión de luz; uno de manera frontal, que determina el

tamaño, y es evaluado con el parámetro FSC (forward scatter), en el cual la fracción de luz dispersa es recogida en la misma dirección que la luz incidente (ángulo cónico de 0–10° con respecto al punto de incidencia del láser); mientras que la dispersión lateral, determina la complejidad de la célula SSC (Side scatter), y la fracción de la luz dispersada, se recoge por un lente a 90° del eje de incidencia del láser. Además, es posible conocer las proteínas que se expresan (marcadores), permitiendo la identificación de diferentes tipos de células. Una vez que las diversas señales son recibidas, se dirigen a través fotodetectores (fotodiodos y tubos fotomultiplicadores), convirtiendo los fotones en electrones y éstos, a su vez, en corriente eléctrica para que puedan ser procesados y traducidos en gráficos e histogramas (figura 12) (Marti et al. 2001; Howard, 2003; Díaz et al. 2010; Fleisher y Oliveira, 2019).

**Figura 12.**

*Esquema general de la citometría de flujo*



Adaptado de Díaz et al. (2010)

Se han realizado diferentes análisis en líneas celulares expuestas a micotoxinas, por medio citometría de flujo, para determinar el estadio de muerte celular en cual se encuentran, posterior al tratamiento. Wang<sup>c</sup> et al. (2014) evidenciaron que ZEA induce apoptosis usando tinción dual con Anexina V/IP, en las células Leydig de rata. Los datos obtenidos por dot plot indican que un 9,2% se encontraba en apoptosis temprana y en un porcentaje de 29,4 %, se encontraba en apoptosis tardía, en los grupos tratados con una concentración de 20  $\mu\text{g/ml}$  de ZEA.

Adicionalmente, en un estudio realizado por Wentzel et al. (2017), utilizaron la doble tinción (Anexina V/IP) en Células HepG2, tratadas con una concentración de 15  $\mu\text{M}$  de FB1,

DON y ZEA. Los resultados arrojaron que el 69,90% de las células expuestas a FB1 seguían siendo viables (Anexina V-FITC negativa y IP negativa), el 18,70 % de las células estaban en apoptosis temprana (Anexina V-FITC positivo) y una pequeña población del 10,9 %, en apoptosis tardía/ necrosis (IP positivo), durante un período de 24 horas Sin embargo, para las células expuestas a DON, solo el 45,10 % eran viables, alrededor del 39,5 %,estaban en apoptosis temprana mientras que el 10,9 %, estaban en apoptosis tardía/ necrosis.

Aproximadamente el 59,5 % de las células HepG2 expuestas a ZEA fueron viables, un 27,5 %, en apoptosis temprana y <9,69 % en apoptosis tardía/ necrosis.

### **2.13 Translocación de la fosfatidilserina y fragmentación de ADN**

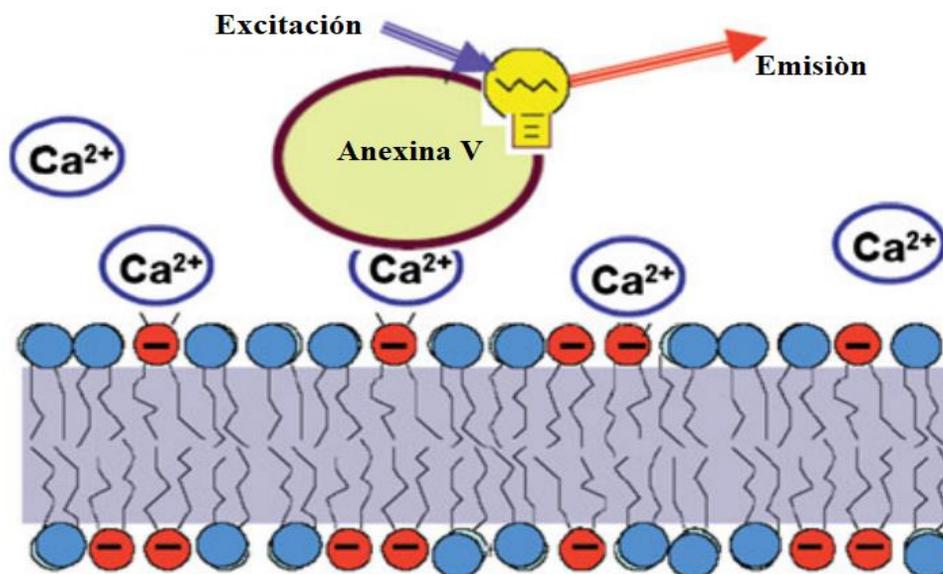
Las células sanas están compuestas por lípidos que se distribuyen asimétricamente en la cara interna y externa de la membrana plasmática. Uno de estos fosfolípidos, es la fosfatidilserina (PS), que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática y, por lo tanto, solo se encuentra expuesta al citoplasma celular. Sin embargo, durante la apoptosis temprana, esta asimetría de los lípidos se pierde, es decir, la PS, se transloca desde la cara interna de la membrana hacia la externa, por la acción de proteínas de membrana (translocasas), permitiendo un mecanismo de reconocimiento para las células fagocíticas (Crowley et al. 2016).

En consecuencia, la anexina V es la sonda más utilizada para caracterizar las poblaciones de células apoptóticas mediante citometría de flujo (Boersma et al, 2005). Es una proteína recombinante de 36KDa dependiente de  $Ca^{2+}$  que se une específicamente a residuos de PS cargados negativamente, expuestos en la superficie externa de la membrana plasmática (figura 13). Además, esta proteína es marcada por fluorescencia, por ejemplo, con Isotiocianato de

fluoresceína (FITC), que se une a las células que se encuentran en la fase de apoptosis temprana (Arur et al. 2003; Demchenko, 2013).

### Figura 13.

*Detección de apoptosis basado en la Anexina V*

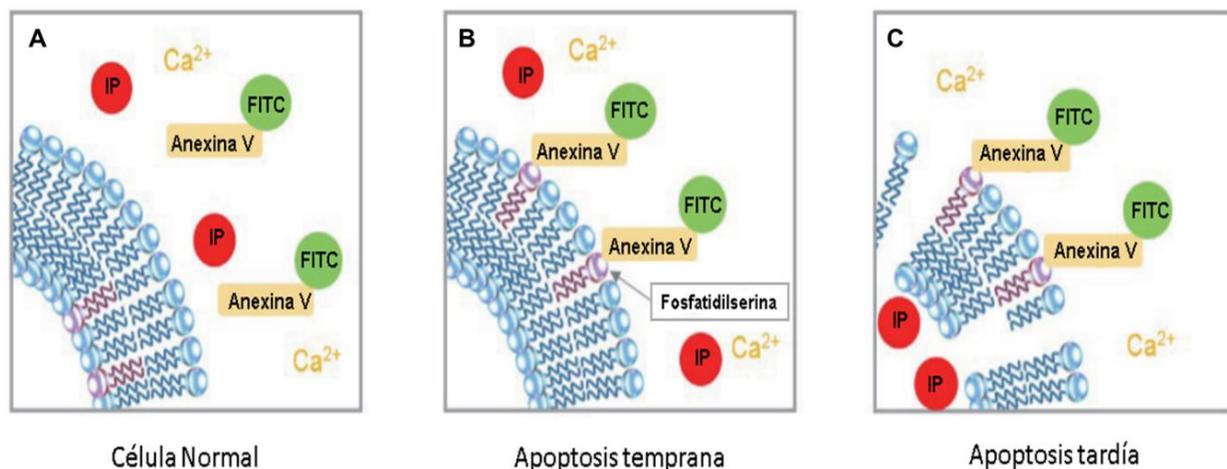


Adaptado de Demchenko (2013)

Además, la tinción con anexina V normalmente se utiliza junto con el marcador catiónico yoduro de propidio (IP), para la identificación de células apoptóticas tempranas y tardías. Las células viables con membranas intactas excluyen el IP, mientras que las membranas de las células muertas y dañadas son permeables al IP, permitiendo la tinción del ADN. Por lo tanto, las células que se consideran viables son Annexina-FITC /IP negativas, las células que están en apoptosis temprana son Annexina-FITC positivas/IP negativas, y las células que están en apoptosis tardía o en necrosis son Annexina-FITC /IP positivas; de esta manera es posible distinguir las células viables y apoptóticas (Figura 14) (Pozarowski et al. 2003; Gasser et al. 2009; Hingorani et al. 2011; Demchenko, 2013).

## Figura 14.

*Detección de apoptosis mediada por los marcadores Anexina V/FITC y yoduro de propidio (IP)*



A) Célula normal. B) Apoptosis temprana. C) Apoptosis tardía  
Adaptado de (Nacalai Tesque, Inc., s. f.)

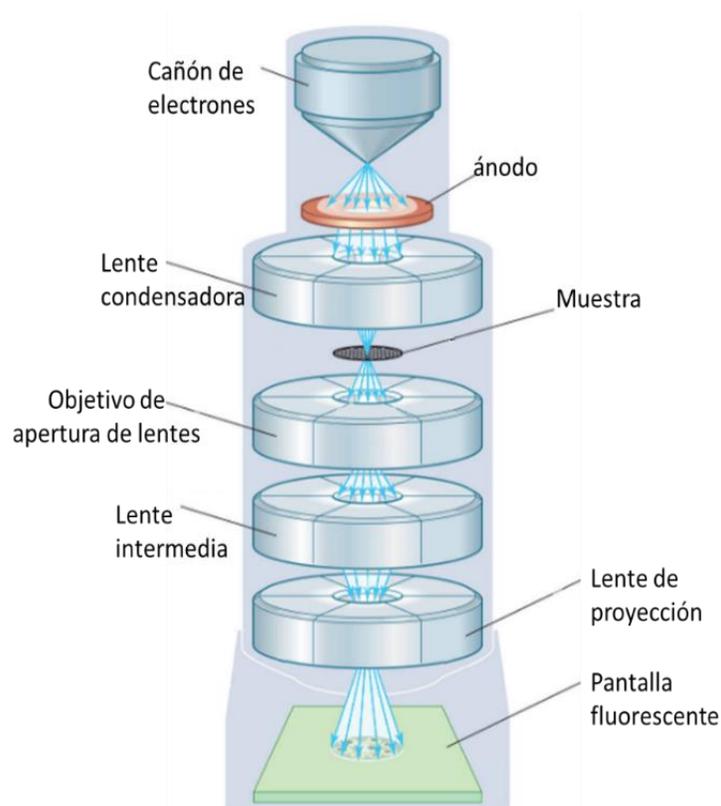
### 2.14 Análisis del potencial de membrana mitocondrial con DiOC6

El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) es un parámetro importante de la función mitocondrial (Sakamuru et al. 2016). Sin embargo, durante la apoptosis, el  $\Delta\psi_m$  disminuye a medida que se da la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial y la pérdida del gradiente electroquímico (Lemasters et al. 2002). Por lo tanto,  $\Delta\psi_m$  es un parámetro esencial de la función mitocondrial que puede utilizarse como indicador de células sanas (Sivandzade et al. 2019). Los cambios en  $\Delta\psi_m$  se pueden medir mediante citometría de flujo como una pérdida en la intensidad de fluorescencia de los colorantes lipofílicos catiónicos específicos de las mitocondrias, utilizando marcadores fluorescentes permeables a la membrana celular, tales como el Yoduro de 3,3'-dihexiloxacarbocianina (DiOC<sub>6</sub>(3)) (Sakamuru et al. 2012). La captación de DiOC<sub>6</sub>(3) depende del potencial de la membrana mitocondrial. En consecuencia, una disminución de  $\Delta\psi_m$  en células apoptóticas, se asocia con una reducción de

DiOC<sub>6</sub>(3) (Zamzami et al. 2000). Este fluorocromo es uno de los más comúnmente utilizados para monitorear los cambios mitocondriales que preceden a la apoptosis nuclear en varios tipos de células, incluidas células tumorales, neuronas, hepatocitos, y timocitos (Kroemer et al. 1997).

### **2.15 Microscopía electrónica de transmisión (MET)**

La microscopía electrónica de transmisión (MET) es una técnica en la que un haz de electrones se transmite a través de una muestra para formar una imagen. Los electrones acelerados se enfocan desde la fuente, en un haz por el lente del condensador, el cual utiliza una pequeña apertura para excluir los electrones que viajan en grandes ángulos con respecto al eje óptico. El haz atraviesa una sección de plástico ultrafina cuyos tejidos y componentes celulares han sido post-fijados en tetraóxido de osmio y teñidos con metales pesados como citrato de plomo y acetato de uranilo que permiten un contraste adecuado sobre la muestra en la región celular o proteica deseada. Partes del haz se difractan, según el espesor y la transparencia de los electrones de la muestra. Los rayos transmitidos se enfocan por el lente del objetivo para formar una imagen, que posteriormente es ampliada por los lentes intermedios y del proyector, en una pantalla de fósforo o una cámara de electrones. La imagen creada por la transmisión diferencial de los electrones se observa a través de un microscopio electrónico (figura 15) (Graham y Orenstein, 2007; Winey et al. 2014; Sciau, 2016; Zuo y Spence, 2017).

**Figura 15.***Esquema de un microscopio electrónico de transmisión*

Adaptado de (transmission electron microscope | instrument | Britannica, s. f.)

En diversos estudios, se ha utilizado la técnica de microscopía electrónica de transmisión para detectar características propias del proceso apoptótico, inducido por micotoxinas. Cai et al. (2020), observaron daño de la ultra estructura de la superficie celular linfocitos T, después del tratamiento con diferentes grupos de toxinas (ZEA 20  $\mu\text{M}$ , DON 1  $\mu\text{M}$ , ZEA 20  $\mu\text{M}$  + DON 1  $\mu\text{M}$ ) durante 48 horas. Se detectaron algunas características como la disminución o incluso desaparición de microvellosidades en la superficie celular, perforación de la membrana celular, aumento de heterocromatina nuclear, hinchazón o vacuolización de mitocondrias y vacuolización en el citoplasma. Otros estudios realizados por Zheng et al. (2016) en las células de Sertoli, se examinaron los cambios ultraestructurales después del tratamiento con 5, 10 y 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de

ZEA durante 24 h, en las cuales observaron vacuolas en el citoplasma, rotura de las mitocondrias y daño en el aparato de Golgi.

## Capítulo III

### 3. Diseño metodológico

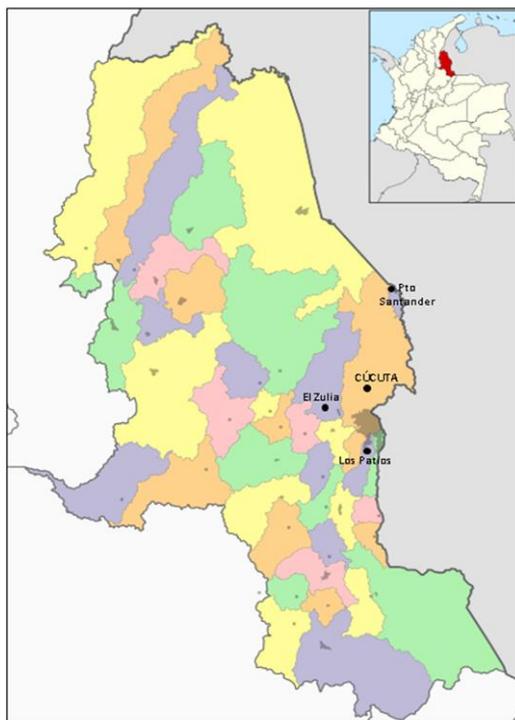
En este capítulo se abordó la metodología utilizada para dar cumplimiento a los diferentes objetivos propuestos en esta investigación.

#### 3.1 Área de estudio

Las muestras de arroz fueron tomadas en cultivos pertenecientes a 4 municipios del Departamento de Norte de Santander (Cúcuta, El Zulia, Puerto Santander y Los Patios) (figura 16).

#### Figura 16.

*Área de estudio, municipios de muestreo en Norte de Santander*



El municipio de Cúcuta, se encuentra situado en el nororiente del país, con una altitud media de 320 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m); presenta un clima cálido y seco, la temperatura promedio es de 28 °C con máximos de 35°C, y presenta una humedad relativa del aire que oscila durante el año entre 62 y 77%. Coordenadas geográficas: Longitud al oeste de Greenwich 72° 30', Latitud Norte 7° 03' (*Cúcuta en la región de Norte de Santander - Municipio y alcaldía de Colombia*, s. f.). El municipio de El Zulia se encuentra a una altitud de 220 m.s.n.m., y presenta una temperatura media de 28°C; en los registros de humedad presenta un valor máximo de 81%, mínimo de 61% y promedio de 72%, no hay datos climatológicos oficiales para este municipio debido a la falta de bases meteorológicas. Coordenadas geográficas: Longitud al oeste de Greenwich 72° 36', Latitud Norte 7° 55' (Alcaldía municipal de El Zulia, 2018). El municipio de Los Patios se localiza a una altura de 410 m.s.n.m., su clima es cálido y su temperatura promedio es de 27°C. Coordenadas geográficas: Longitud al oeste de Greenwich 72° 50', Latitud Norte 7° 50' (*Cúcuta nuestra*, s.f.); en cuanto al municipio de Puerto Santander, posee un clima cálido, se encuentra ubicado geográficamente en la parte nororiental del territorio colombiano, con una altura de 60 m.s.n.m, con una temperatura promedio de 29°C y con humedad relativa del 82%. Coordenadas geográficas: Longitud al oeste de Greenwich 72° 24', Latitud Norte 8° 21' (Alcaldía de Puerto Santander, 2018).

### **3.2 Muestreo**

Las muestras de arroz de cultivo (15) fueron tomadas de los 4 municipios, se almacenaron en bolsas de papel, se procesaron y analizaron en el laboratorio de Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN) de la Universidad de Pamplona, atendiendo a la codificación presentada en la tabla 3.

**Tabla 3.***Procedencia y codificación de las muestras de arroz de cultivo*

<b>CÓDIGO</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
M001	Cúcuta
M002	Cúcuta
M003	Cúcuta
M004	Cúcuta
M005	Los Patios
M006	El Zulia
M007	El Zulia
M008	El Zulia
M009	El Zulia
M010	Puerto Santander
M011	Puerto Santander
M012	Puerto Santander
M013	Los Patios
M014	Los Patios
M015	Los Patios

### 3.3 Cuantificación de Zearalenona por HPLC

Para la detección y cuantificación de ZEA, se aplicó el método oficial de análisis de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), teniendo en cuenta la Norma Técnica Colombiana NTC 4881:2000 (Método de análisis de Zearalenona de ocurrencia natural). Método que ha sido estandarizado en el laboratorio de toxicología de la Universidad Nacional de Colombia.

Para la extracción de ZEA, 2) se adicionaron 25 g de arroz molido a una mezcla de acetonitrilo: agua (84:16), se filtró y se homogenizó la muestra con ácido acético glacial (mejora la recuperación de ZEA en un 20%; recuperación sin ácido: 70%, con ácido: 90%).

Posteriormente, se purificó en una columna Micotox® 2004. El extracto purificado se diluyó (1:1) con agua para ser inyectado en el HPLC. La ZEA es separada de las posibles interferencias en una columna de fase reversa (octadecilsilano o RP-18) usando un cromatógrafo

líquido de alta eficiencia. La detección de ZEA se logra mediante un espectrofotómetro de fluorescencia, el cual se acopla a un integrador – graficador para cuantificar la micotoxina utilizando un método de estándar externo. En la figura 17, se evidencian los cromatogramas obtenidos por HPLC; en la figura 17A se observa el estándar de ZEA, el cual presentó un tiempo de retención de 5,37 minutos, y en la figura 17B, se observa el cromatograma de una muestra positiva para ZEA, con un tiempo de retención de 5,34 minutos.

### 3.3.1 Condiciones cromatográficas (HPLC)

**Cromatógrafo:** Shimadzu Prominence.

**Inyector automático:** SIL-20AHT.

**Bomba cromatográfica:** bomba binaria LC -20AB.

**Horno cromatográfico:** CTO-20HT.

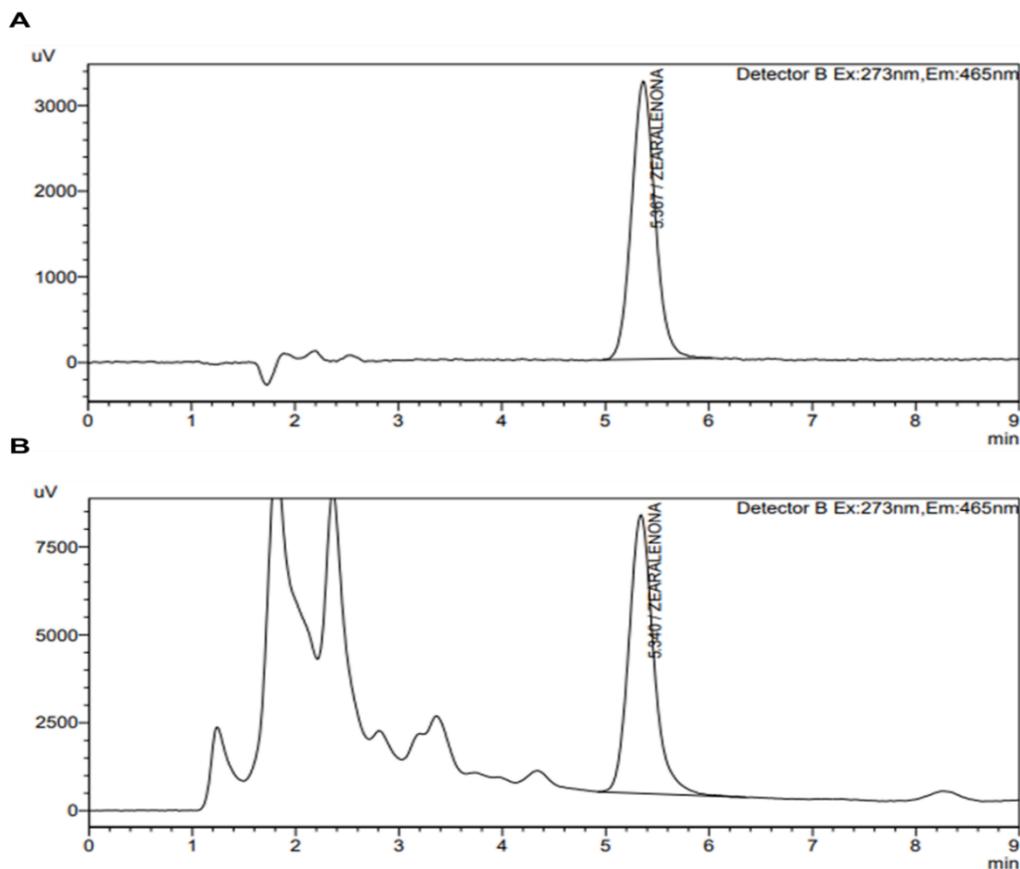
**Columna analítica:** Merck LiChroCART® 125 – 4 HPLC – Cartridge LiChrospher® 100 RP – 10 (5 µm).

**Detector de fluorescencia de longitudes de onda variables:** Fluorescencia (FLD) 20AXL, condiciones de operación: excitación 273 nm, emisión 465 nm, respectivamente (GAIN = 2).

**Fase móvil:** Ácido acético 1 %, MeOH 30:70 (v/v) Flujo: 0.8 ml/min.

**Figura 17.**

*Cromatogramas por HPLC*



A) Estándar de ZEA con un tiempo de retención de 5,37 minutos. B) Muestra positiva para ZEA con un tiempo de retención de 5,34 minutos

### 3.4 Aislamientos de hongos del género *Fusarium* spp

Para el aislamiento de *Fusarium* spp., se tomaron cuatro (4) granos de arroz de las muestras (M009, M010 y M011) en las que se detectó la presencia ZEA mediante la técnica de HPLC; y se colocaron en la superficie de placas con medio PDA (Difco Laboratories, Detroit, MI), por triplicado. Posteriormente, se incubaron a 25°C durante 7 días. Se observó el micelio crecido en los granos de arroz de las tres (3) muestras y se escogió la muestra M009 para el aislamiento en medio PDA (25°C, durante 7 días), hasta obtener un cultivo con apariencia pura,

con características pertenecientes al género *Fusarium*, principalmente para evaluar la pigmentación y morfología de la colonia con base en las descripciones de Summerell et al. (2003) y Leslie y Summerell, (2006). Finalmente, a partir del cultivo puro de la muestra M009, se tomó un disco de 5 mm de diámetro del borde de las colonias y se colocó al centro de cada placa, para determinar la tasa de crecimiento del micelio en 3 medios de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa), Avena y Glicerol Dicloran (DG18%) (Oxoid, Basingstoke, UK). Las placas se incubaron a 25°C y se midió el diámetro de las colonias a los 3 y 7 días (Leslie y Summerell, 2006; Kumar *et al.*, 2010). Se registró la morfología de las colonias, la pigmentación del micelio aéreo y la morfología de las esporas por microscopía óptica.

### **3.5 Liofilización de Zearalenona**

El proceso de liofilización de ZEA, se realizó a partir de un estándar de la micotoxina ZEA (Micotox ® Zearalenona-HPLC; concentración 10 µg/ml de Zearalenona en metanol). Este proceso consistió en la diálisis en Buffer Tris a 25 mM (24 Horas/ 4°C en agitación). Posteriormente, el contenido se traspasó a un tubo Falcon y se congeló durante 24 horas, finalmente se realizó el proceso de liofilización por 24 horas al vacío (Garzón-González et al. 2021).

### **3.6 Cultivo de la línea celular HepG<sub>2</sub>**

La línea celular HepG<sub>2</sub> (carcinoma de hepatoblastoma humano) se cultivó en RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino, hasta obtener una confluencia del 80%. Posteriormente, las células se disociaron con tripsina 0,25% y se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos, a una densidad de 20,000 células/100µl por pozo, se dejaron durante 24 horas para la adhesión celular

y luego se adicionó la micotoxina ZEA liofilizada en DMSO a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 15  $\mu$ M durante 48 y 72 horas (Jaimes et al. 2016).

### 3.7 Ensayo citotoxicidad

El efecto de ZEA sobre la viabilidad celular se determinó usando el ensayo MTT. Después de 48 y 72 horas de tratamiento con la micotoxina ZEA, se evaluó la viabilidad celular adicionando 100  $\mu$ l de MTT (0,5 mg/ml) y se incubó 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  $\mu$ l de isopropanol ácido para solubilizar los cristales de formazan durante 1 hora en agitación suave. Finalmente, se examinó la densidad óptica de la solución solubilizada a 492 nm (espectrofotómetro Tecan Spectra classic) (Kupcsik, 2011). El efecto de la micotoxina ZEA sobre las células HepG<sub>2</sub>, se expresó como valores del porcentaje de inhibición usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = [1 - (\text{absorbancia media de células tratadas} / \text{absorbancia media del control})] \times 100$$

### 3.8 Concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub>)

La concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub>), es la concentración de las micotoxinas necesaria para inhibir el 50% del crecimiento en las células. La CI<sub>50</sub> 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 la micotoxina ZEA. 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).

### **3.9 Detección de la muerte celular por microscopía electrónica de transmisión (MET)**

Se sembraron  $3 \times 10^6$  células HepG<sub>2</sub> en placas de cultivo durante 24 horas para permitir la adhesión celular. Posteriormente, las células HepG<sub>2</sub> fueron expuestas a una concentración de ZEA de 10  $\mu$ M durante 48 horas. Al finalizar el tiempo del tratamiento, la monocapa celular se disoció con tripsina al 0,25%, se lavó 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 (glutaraldehído-formaldehído al 3 % en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3) (Palacios y Mendoza, 1972). Posteriormente, 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, finalmente, se infiltró el pellet celular con resina epoxídica a concentraciones ascendentes y se incluyó en resina epoxídica. Del pellet de células incluidas se realizaron secciones de 1 micra de espesor, las cuales fueron coloreadas con p-fenil-endiamina en solución acuosa al 1% (p/v) y de 90 nanómetros de espesor, que se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para el análisis ultraestructural (Watson, 1958; Reynolds, 1963). Los cambios morfológicos propios de la apoptosis en las células HepG<sub>2</sub>, se analizaron por microscopía electrónica de transmisión.

### **3.10 Extracción de neutrófilos polimorfonucleares (PMN)**

Se recolectó sangre de cinco (5) personas sanas al azar, que fueron etiquetadas de la siguiente manera: M, para el control negativo; M1, M2, M3, M4, y M5, para las muestras con tratamiento; la cuales se procesaron simultáneamente. Se tomó por venopunción 20 ml de sangre

periférica en tubos con 0,5 ml de heparina y se mezcló suavemente. Se adicionó 1.5 ml de dextrán al 6% en solución salina al 0.9% y el tubo se dejó en posición vertical durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se traspasó a otro tubo Falcón la fase de células blancas y se adicionó medio RPMI, subsecuentemente, se realizó la separación de PMN mediante gradiente de densidad con Ficoll en proporción 3:1 y se centrifugó a 1800 rpm por 30 minutos a 18°C. Se descartó el sobrenadante y se realizó lisis osmótica de los glóbulos rojos durante 30 segundos con agua destilada estéril y fría. Se realizaron 3 lavados con medio RPMI durante 5 minutos a 2000 rpm a 4°C y las células se resuspendieron nuevamente en RPMI. Finalmente, los PMN se cuantificaron por el método de exclusión del colorante azul de tripano y se ajustaron con RPMI-suero fetal bovino al 10% a  $2 \times 10^6$  células/500  $\mu$ L (Jaimes et al. 2016).

### **3.11 Características de la muerte celular por citometría de flujo**

Se preparó la suspensión celular para las cinco (5) muestras control y con tratamiento, que contenía  $2 \times 10^6$  células/ml en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino. La suspensión celular de las muestras con tratamiento, se expusieron a una concentración de 6,40  $\mu$ M de ZEA, cada una por duplicado; estas se incubaron a 37°C en baño serológico durante 2 horas y posteriormente se realizaron los diferentes ensayos para la determinación de las características de la muerte celular, por citometría de flujo como se describen a continuación.

### **3.12 Detección de la fosfatidilserina y análisis de la fragmentación de ADN**

Después del tratamiento con 6.40  $\mu$ M ZEA durante 2 horas, los neutrófilos (PMN) se lavaron y resuspendieron en 500  $\mu$ L de buffer de unión con 5  $\mu$ L de Annexina V y 5  $\mu$ L de PI, a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se lavaron con PBS 1X a

2000 rpm durante 5 minutos a 4°C y nuevamente se resuspendieron en PBS. La lectura se realizó por citómetro de flujo FACsort y el programa Cell Quest. La detección de la fosfatidilserina y el análisis de la fragmentación de ADN, se estimaron como el porcentaje de células que emiten fluorescencia con relación al control, utilizando el programa Flowing software 2 (Rojas et al. 2014).

### **3.13 Análisis del potencial de membrana mitocondrial**

Posterior al tratamiento con 6,40  $\mu$ M ZEA durante 2 horas, los neutrófilos (PMN) se resuspendieron para un lavado con 500  $\mu$ L de medio RPMI a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. El pellet celular se incubó con 5  $\mu$ L de Dioc<sub>6</sub> durante 30 minutos en la oscuridad. Las células se resuspendieron en RPMI y se lavaron dos veces más a 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. La lectura se realizó por citómetro de flujo FACsort y el programa Cell Quest. La pérdida del potencial de membrana (actividad de DIOC<sub>6</sub>), se estimó como el porcentaje de células que emiten fluorescencia con relación al control, utilizando el programa Flowing software 2 (Rojas et al. 2014).

### **3.14 Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó usando el software GraphPad Prism 8. Los porcentajes de proliferación celular obtenidos con el ensayo de citotoxicidad (MTT), y el porcentaje de células obtenido por citometría de flujo para el ensayo de detección de la fosfatidilserina, análisis de la fragmentación de ADN y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, fueron expresadas como la media  $DE \pm$  (n=3), versus el control. Los datos se analizaron con ANOVA de una vía y

el test comparaciones múltiples de Dunnett's. \* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  y \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Mediante el software infostat, se realizó el análisis de la concentración inhibitoria, es decir, la concentración de la micotoxina ZEA necesaria para inhibir el 50% ( $CI_{50}$ ) del crecimiento en las células HepG<sub>2</sub>, se midió 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 ZEA evaluada. 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).

## Capítulo IV

### 4. Resultados y discusión

Finalmente se presentan los datos obtenidos con su respectivo análisis, a partir de la metodología planteada en la presente investigación.

#### 4.1 Cuantificación de Zearalenona

Los valores obtenidos en la cuantificación de ZEA para las 15 muestras de arroz en cultivo, se encuentran registrados en la tabla 4. Se detectó la presencia de ZEA en las muestras: M009 (98  $\mu\text{g/Kg}$ ), M010 (167  $\mu\text{g/Kg}$ ) y M011 (490  $\mu\text{g/Kg}$ ), correspondiente a los municipios de El Zulia (1 muestra) y Puerto Santander (2 muestras) de donde fueron tomadas, respectivamente. Dado que las condiciones óptimas para la producción de ZEA dependen en gran parte de los factores ambientales como temperatura, humedad relativa y actividad del agua; los municipios de El Zulia y Puerto Santander presentan condiciones ambientales propicias para el desarrollo de *Fusarium* spp. y así mismo, para la producción de ZEA, puesto que investigaciones han demostrado que los altos niveles de ZEA en granos, frecuentemente se encuentran en entornos cálidos y húmedos (Kovalsky et al. 2014) y se sintetiza a temperaturas de 25°C con un  $A_w$  de 0.96, siendo estos parámetros, los óptimos (Milani, 2013).

**Tabla 4.** *Cuantificación de ZEA en las muestras de arroz en cultivo*

<b>CÓDIGO</b>	<b>ZEA (µg/kg)</b>
M001	N.D*
M002	N.D*
M003	N.D*
M004	N.D*
M005	N.D*
M006	N.D*
M007	N.D*
M008	N.D*
M009	<b>98</b>
M010	<b>167</b>
M011	<b>490</b>
M012	N.D*
M013	N.D*
M014	N.D*
M015	N.D*

(\*) No Detectable

De igual manera, la presencia y cuantificación de ZEA en este estudio, coincide con reportes realizados en arroz en diferentes países. En Korea, Park et al. (2005) utilizando HPLC, detectaron a ZEA en 3 de las 88 muestras de arroz pulido analizadas (3.4%) en concentraciones entre 21.7 - 47 µg/kg. Sin embargo, en España Ibáñez et al. (2011) reportaron que el 50% de las muestras de arroz analizadas por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC), presentaban una contaminación con un nivel promedio de 5.22 µg/kg de ZEA. Valores más altos de ZEA se detectaron por Cromatografía en Capa Fina (CCF) en muestras de arroz parbolizado en Brasil, con concentraciones entre 317- 396 µg/kg, en el 19% de las muestras analizadas (Dors et al. 2011). En estudios posteriores en India, por Rai et al. (2018) detectaron ZEA en el 80% de las muestras de arroz analizadas con un promedio de 94.5 µg/kg, utilizando HPLC.

En consecuencia, la contaminación por micotoxinas está influenciada por deficiencias en el manejo y almacenamiento del grano, daños causados por insectos o plagas, así como también, por distintos factores como condiciones climáticas que desencadenan la proliferación de hongos

filamentosos (Paterson y Lima, 2010). Por otra parte, la carencia de recomendaciones para prevenir la contaminación de alimentos por micotoxinas, y la deficiencia de directrices para los niveles de tolerancia, puede ser considerado un factor que pone en riesgo la salud de los consumidores y limita el desarrollo de inspecciones necesarias que garanticen la inocuidad de los alimentos; así que, a fin de garantizar la seguridad de los cereales y los productos a base de cereales utilizados como alimentos y piensos, es necesario implementar controles y monitoreo para definir sus niveles permisibles.

Por lo tanto, estos resultados pueden contribuir a la generación de reglamentos que contemplen la importancia de la contaminación de ZEA en el arroz, ya que no existe una referencia de los valores límites máximos permitidos.

Por esta razón, es de gran importancia conocer la incidencia de hongos productores de micotoxinas en cereales como el arroz; ya que la continua exposición, puede ocasionar graves riesgos para la salud humana y animal (Amirahmadi et al. 2018); además, el crecimiento de hongos es una de las principales causas del deterioro de los cereales (Moss, 1996).

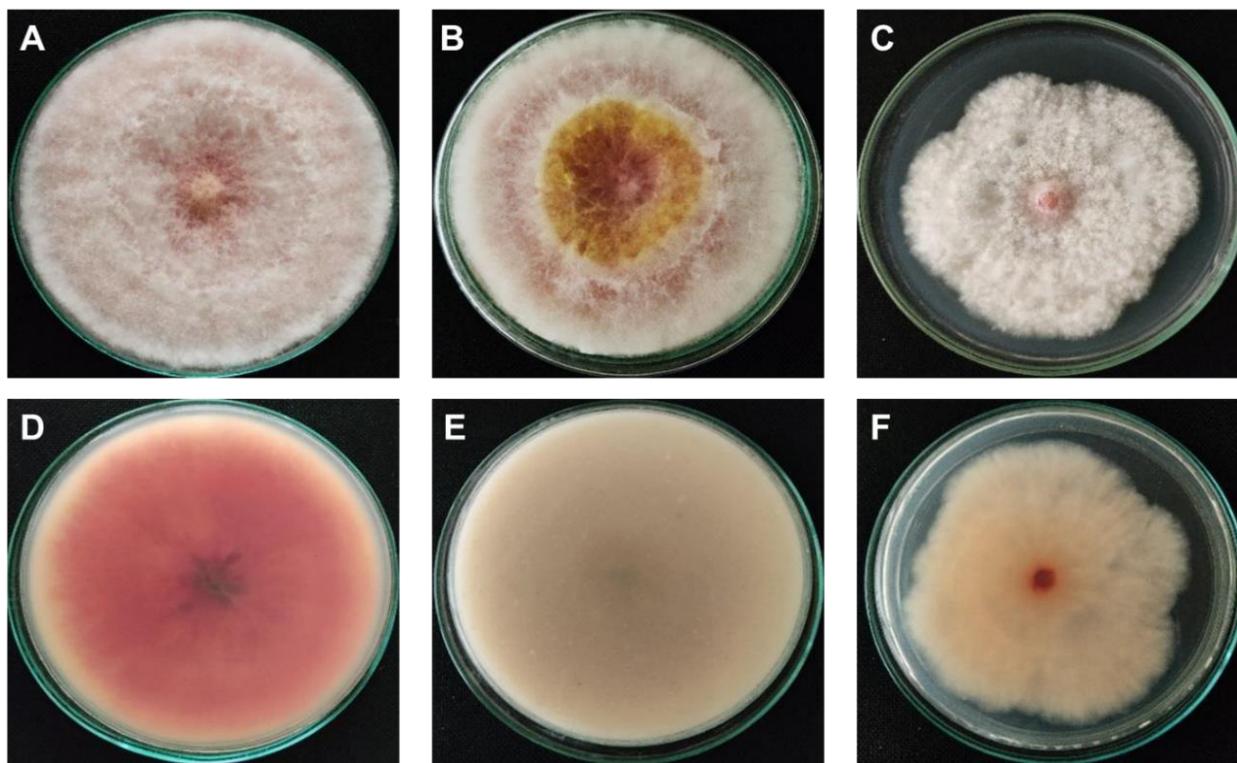
Sin embargo, no solo se detectaron niveles considerables de ZEA en el arroz de cultivo, sino que también, por medio de análisis microbiológicos, se confirmó la presencia de *Fusarium* spp., uno de los principales hongos toxigénicos.

#### **4.2 Aislamiento de *Fusarium* spp.**

A partir de la detección de ZEA en las muestras de arroz (M009, M010 y M011), se pudo corroborar morfológicamente la presencia de *Fusarium* sp. Sin embargo, para determinar las características morfológicas macroscópicas, se escogió el *Fusarium* de la muestra M009 y se realizó el aislamiento en tres (3) medios de cultivo (PDA, AVENA y DG18) (figura 18).

## Figura 18.

*Características macroscópicas de Fusarium sp.*



**A).** Anverso de colonia de *Fusarium* spp. en medio PDA, **B).** Anverso de colonia de *Fusarium* spp. en medio Avena, **C).** Anverso de colonia de *Fusarium* spp. en medio DG18, **D).** Reverso de colonia de *Fusarium* spp. en medio PDA, **E).** Reverso de colonia de *Fusarium* spp. en medio Avena, **F).** Reverso de colonia de *Fusarium* spp. en medio DG18

En los medios estudiados, se evidenciaron las características morfológicas macroscópicas, como el color y la textura de las colonias. En medio PDA, se produjo gran cantidad de micelio aéreo algodonoso de color blanco, con tonalidades rosadas (figura 18A); en el reverso del agar se observaron pigmentos color rosa-púrpura (figura 18B). En el medio Avena, se presentó abundante micelio algodonoso con dos coloraciones diferentes, blanco y amarillo, tornándose rosado a medida que maduraba el cultivo (figura 18D); no presentó pigmentos al reverso del agar (figura 18E). En cuanto al medio DG18, se obtuvo un micelio aéreo algodonoso blanco con centro rosado de crecimiento irregular (figura 18C), es decir, al medir el diámetro

desde el centro a cualquier borde, la medida no era la misma. En el reverso se podía observar una pigmentación de color rosado en el centro y blanco en el resto del cultivo (figura 18F).

Mediante el uso de estos medios de cultivo, se pudo conseguir una variación en la fuente de carbono aportada, siendo uno de los factores principales que influyen en el crecimiento fúngico, sin embargo, el color del micelio y pigmentos que desarrollan depende de la especie, y son muy variables, siendo blanco, crema, anaranjado, rosa, rojizo o púrpura. Sin embargo, como se observa en estos resultados, las características morfológicas de una especie que son comunes en un medio de cultivo, pueden perderse o alterarse cuando se realiza el aislamiento en un medio diferente (Leslie y Summerell, 2006).

Así mismo, a partir del cultivo puro aislado de la muestra M009, se determinó el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en los tres medios de cultivo (Tabla 5), donde se observa que en los medios PDA y Avena hubo mayor desarrollo, alcanzando en el séptimo día un diámetro de 90 mm, mientras que en el medio DG18 se presentó un diámetro de 77 mm.

**Tabla 5.**

*Comparación del crecimiento micelial de Fusarium sp*

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Diámetro en mm</b>	
	<b>3 días</b>	<b>7 días</b>
<b>PDA</b>	73	90
<b>AVENA</b>	70	90
<b>DG18</b>	42	77

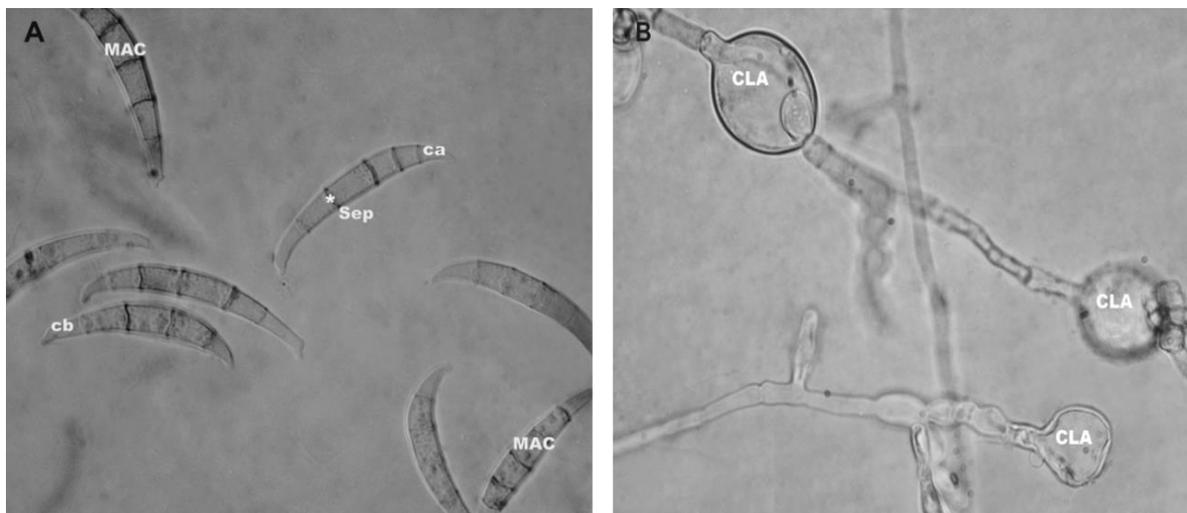
Los resultados obtenidos coinciden con la afirmación de Leslie y Summerell (2006), Stepień *et al.*,(2013) y Souza *et al.*,(2018), quienes indican que el crecimiento y la esporulación del micelio de *Fusarium* spp. está influenciado por el medio de cultivo utilizado.

Las especies de *Fusarium*, tienen varias características microscópicas que las ayudan a identificar y diferenciar; tales como: tamaño y forma de las macroconidias, presencia o ausencia de microconidias; además de estructuras de resistencia y propagación como las clamidosporas (Booth, 1977; Liliana et al. 2014). De tal modo, que, en la morfología microscópica observada, se pudo evidenciar la ausencia de microconidias y la presencia de macroconidias, las cuales presentaban forma de medialuna, hialinas y multiseptadas (entre 4 y 5), y células apicales alargadas, curvadas y basales con forma de pie (figura 19A). También se pudo observar estructuras de resistencia como las clamidosporas, globosas, lisas de doble pared, simples, tanto en orientaciones terminal e intercalar (figura 19B).

Todas estas características fenotípicas, permiten la identificación presuntiva a nivel de género que generalmente se realiza a partir de la apariencia de la colonia, seguido de la confirmación microscópica (IARC, 2012). Por lo tanto, estos resultados presuntivamente corresponden con las descritas por Leslie y Summerell (2006) para aislados de *Fusarium graminearum*, una de las especies de *Fusarium* más importantes, asociada con la producción de ZEA. Sin embargo, el conocimiento taxonómico de *Fusarium* spp. es limitado debido a la similitud de las especies y la insuficiencia de caracteres morfológicos distintivos, con identificación basada en macro y microconidios en varias especies (Marasas et al. 1984).

## Figura 19.

### *Características microscópicas de Fusarium spp*



A) Macroconidias; B) Clamidosporas. MAC: Macroconidias, Sep:septos, cb: célula basal, ca: célula apical, CLA: Clamidosporas. Microscopio óptico Nikon, 1000X

Los resultados anteriormente mencionados, evidencian la presencia de ZEA en tres (3) muestras de arroz de cultivo y, a su vez el aislamiento de *Fusarium* sp.; y se puede considerar a este hongo toxigénico como contaminante natural del arroz. De modo que, es fundamental, la detección e identificación de micotoxinas, ya que la presencia de hongos no necesariamente implica su producción, no obstante, el hongo puede estar ausente, pero no se puede asegurar que la micotoxina también lo esté (Carlson y Ensley, 2003).

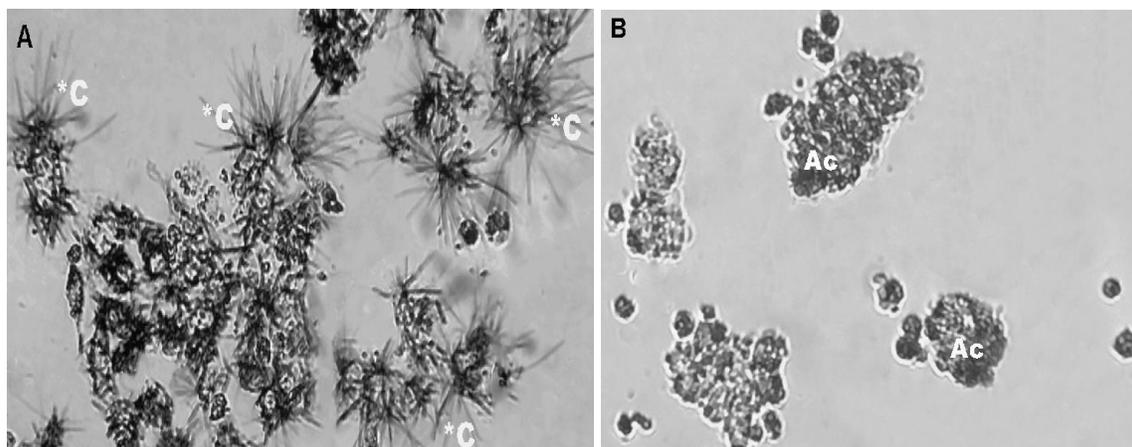
### 4.3 Efecto de la citotoxicidad de ZEA sobre células HepG<sub>2</sub>

La toxicidad de ZEA se pudo determinar con la medición de la viabilidad de la línea celular HepG<sub>2</sub>, como modelo para establecer el efecto citotóxico sobre los hepatocitos, siendo el hígado, el sitio prominente para la metabolización y para procesos oxidativos intensos en el cuerpo (Gazzah et al. 2013).

Por consiguiente, la viabilidad se determinó por la capacidad de formación de los cristales de formazán por las células HepG<sub>2</sub> metabólicamente activas. Las células que no fueron expuestas a ZEA, presentaron una actividad metabólica alta, debido a la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) en cristales de Formazán (figura 20A), en comparación con las células tratadas con 15µM a las 48 horas, en las cuales la actividad metabólica disminuyó, evidenciándose el efecto antiproliferativo que causa ZEA en las células HepG<sub>2</sub>, como se muestra en la figura 20B.

### Figura 20.

*Evaluación de la actividad metabólica en las células HepG<sub>2</sub> por reducción de MTT*



**A)** Células HepG<sub>2</sub> sin tratar. **B)** Células HepG<sub>2</sub> expuestas a 15 µM de ZEA durante 48 horas. Aumento:400. C= Cristales de Formazán, Ac= Agrupación celular. Microscopio óptico invertido Nikon 37762

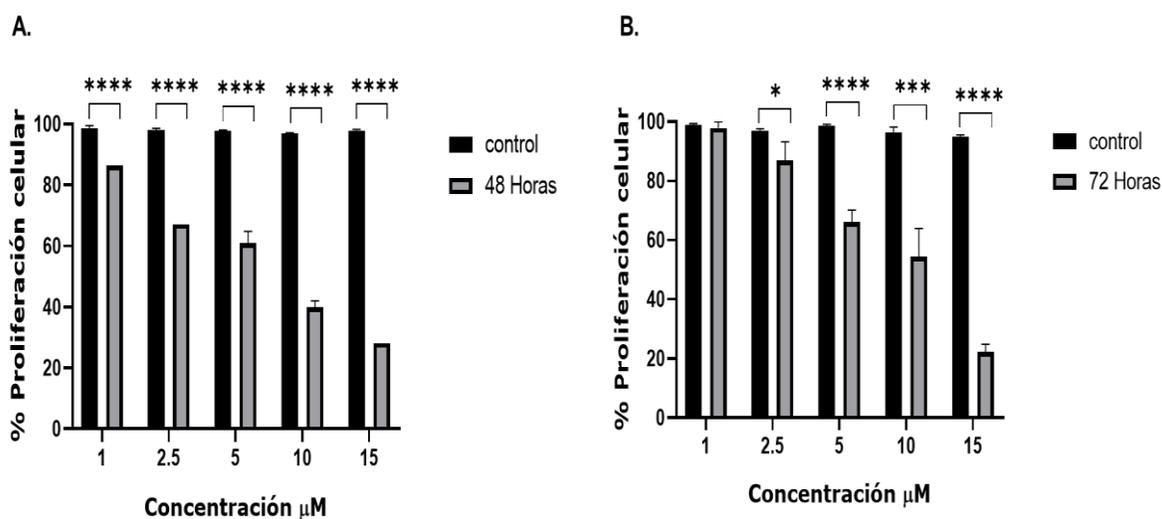
El tratamiento con diferentes concentraciones de ZEA (1, 2.5, 5, 10 y 15 µM), causó efectos citotóxicos sobre la proliferación de las células HepG<sub>2</sub>. En las Figuras 21A y 21B, se evidencia que ZEA promueve la inhibición de la proliferación celular, de manera dependiente de la concentración a las 48 y 72 horas de exposición, por lo tanto, se observó un efecto

significativo a partir de 5  $\mu\text{M}$  (60,88%  $\text{DE}\pm 3,89$  y 66,020%  $\text{DE}\pm 4,13$ ) en comparación con el control (97,78%  $\text{DE}\pm 0,27$  y 98,57%  $\text{DE}\pm 0,57$ ) respectivamente ( $p < 0,0001$ ).

Así mismo, a mayor tiempo de exposición con ZEA (72h), mayor fue el efecto de la concentración (15  $\mu\text{M}$ ), sobre el porcentaje de proliferación celular, el cual fue reducido significativamente (22,22%  $\text{DE}\pm 2.63$ ), en comparación con el porcentaje obtenido a las 48 horas (28,25%) ( $p < 0,0001$ ).

### Figura 21.

*Proliferación de las células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones de ZEA (1, 2.5, 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ )*



A) 48 y B) 72 horas. Los datos se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar. \*\*\*\* $p < 0,0001$  versus el control usando ANOVA

Ayed-Boussema et al. (2008), evidenciaron que ZEA disminuyó la proliferación de las células HepG<sub>2</sub>, a una concentración de 120  $\mu\text{M}$ , después de 24 horas de tratamiento con porcentajes de 55%. No obstante, Lee et al. (2013), obtuvieron una disminución de la viabilidad en las células Chang de hígado humano, después del tratamiento con ZEA a una concentración

de 200  $\mu\text{M}$  a las 12 y 24 horas de exposición, con porcentajes de 19.3% y 41.5%, respectivamente.

Varios autores coinciden en que los resultados de los estudios, varían según las condiciones de cada ensayo, ya que, en estudios realizados por Gazzah et al. (2010) con el ensayo de hidrólisis de diacetato de fluoresceína (FDA) en HepG<sub>2</sub>, obtuvo un porcentaje de inhibición del 90% a las 60 horas de exposición a una concentración de 268  $\mu\text{M}$  de ZEA; Viera et al. (2015) con el ensayo de rojo neutro en leucocitos de sangre periférica humana (PBL), obtuvo porcentajes de inhibición entre un 30 -64%, después del tratamiento con ZEA por 1 hora con concentraciones entre 10 - 80  $\mu\text{g/ml}$ .

Los resultados revelaron que la concentración inhibitoria ( $\text{CI}_{50}$ ) obtenida después de las 48 y 72 horas del tratamiento celular con ZEA, indujo una reducción en la proliferación celular en función de la dosis y el tiempo de exposición puesto que, a las 48 horas, el valor de  $\text{CI}_{50}$  fue de 6,40  $\mu\text{M}$   $\text{DE}\pm 0,33$  y a las 72 horas la  $\text{CI}_{50}$  fue mayor con un valor de 9,41  $\mu\text{M}$   $\text{DE}\pm 0,64$ . De modo que, a mayor tiempo, mayor es la  $\text{CI}_{50}$  necesaria para inhibir el 50% de la población celular. Con base en estos resultados, se pudo observar que el efecto citotóxico sobre las células HepG<sub>2</sub> es mayor a medida que aumenta la concentración de ZEA, indicando que la exposición a esta micotoxina afecta la proliferación celular y por ende genera pérdida de la actividad metabólica.

Estos resultados difieren de los obtenidos por diferentes autores en lo que se han reportado  $\text{CI}_{50}$  desde 70 hasta 250  $\mu\text{M}$  en la línea celular HepG<sub>2</sub>, mediante el ensayo MTT a las 24 horas de tratamiento con ZEA (Hassen et al. 2005; Gazzah et al. 2013; Tatay et al. 2014; Karaman et al. 2020). No obstante, en un estudio realizado por Kouadio et al. (2005), con el

mismo ensayo, obtuvieron una  $CI_{50}$  de 25  $\mu M$  a las 24 horas de tratamiento con ZEA en la línea Caco-2.

Los resultados obtenidos variaron, debido a las condiciones evaluadas en este estudio, tales como la liofilización de la micotoxina, el tipo de línea celular, concentraciones, tiempo de exposición y las características del patrón utilizado. No obstante, se pudo evidenciar que el efecto citotóxico de ZEA sobre las células HepG<sub>2</sub>, es mayor a medida que aumenta la concentración y el tiempo. De tal modo, se puede inferir que la exposición a ZEA genera disminución en la proliferación celular, pérdida de la actividad metabólica y causa la muerte en diferentes tipos de células (Ben et al. 2015; Zheng et al. 2016). Esta muerte celular puede ser el resultado de varios daños celulares y bioquímicos, e inducción de la detención del ciclo celular, estrés oxidativo, daño en el ADN y apoptosis (Zhang et al. 2017).

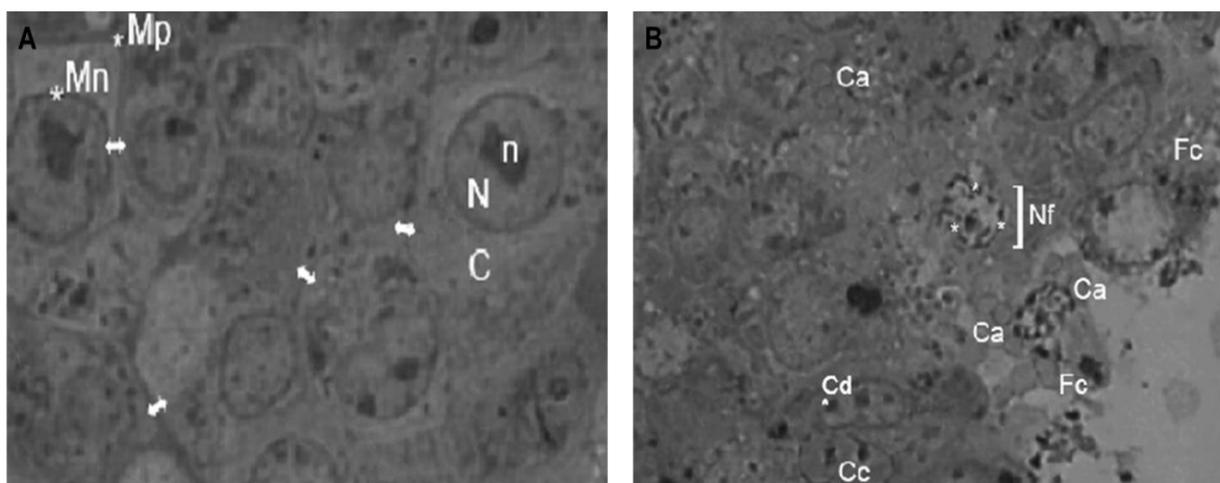
#### **4.4 Cambios morfológicos en células HepG<sub>2</sub> causados por ZEA**

Mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron los cambios morfológicos de HepG<sub>2</sub> después del tratamiento con 10 $\mu M$  de ZEA durante 48 horas. A continuación, se describen los cambios en las células HepG<sub>2</sub> del grupo control, en el cual, el núcleo mantuvo su forma redondeada con zonas claras y oscuras que corresponden a la cromatina, con la presencia de uno o varios nucléolos, además, la membrana plasmática y nuclear se mantuvo intacta. Debido a que las células HepG<sub>2</sub> presentan una morfología epitelial, se pudo observar las uniones en monocapa y el contacto célula a célula (figura 22A). En las células HepG<sub>2</sub> tratadas con ZEA se evidenciaron los siguientes cambios morfológicos: contracción celular, pérdida del contacto célula a célula, cromatina dispersa y condensada,

fragmentación nuclear y celular, formación de vesículas o cuerpos apoptóticos (figura 22B). Estos cambios morfológicos pueden estar relacionados con un proceso apoptótico en la célula HepG<sub>2</sub>.

### Figura 22.

*Microscopía electrónica de transmisión de las células HepG<sub>2</sub> expuestas a 10 μM de ZEA durante 48 horas*



A) Control negativo. B) Células tratadas con 10 μM de ZEA. Aumento: 4.000X. Mp= Membrana Plasmática, C= Citoplasma, N= Núcleo, n= nucléolo, Mn= Membrana nuclear, Cm= Cromatina, Flecha con doble punta= Contacto célula a célula, Nf= Núcleo fragmentado, Cd= Cromatina dispersa, Ca= Cuerpos apoptóticos, Fc= Fragmentación celular, Cc= Célula contraída. Microscopio electrónico de transmisión (H-7000, Hitachi)

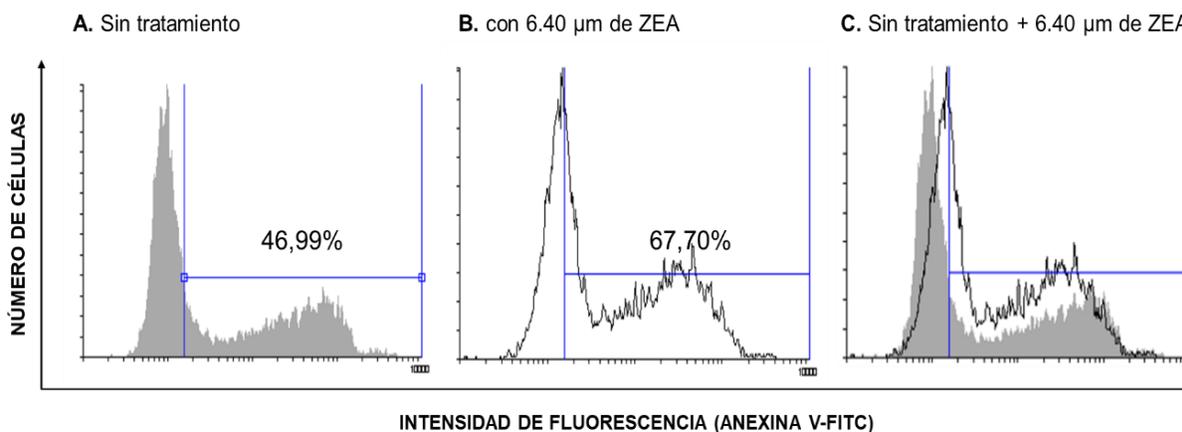
Estudios con ZEA han reportado cambios morfológicos en diferentes tipos de células, como los obtenidos por Cai et al. (2020) al exponer linfocitos T a una concentración de 20 μM por 48 horas, provocando daño por disminución o incluso desaparición de microvellosidades en la superficie celular, fragmentación de la membrana celular, aumento de heterocromatina nuclear, hinchazón o vacuolización de mitocondrias y citoplasma. Así mismo, Wang<sup>a</sup> et al. (2014), observaron condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, y formación de cuerpos apoptóticos incorporados a la membrana en células de Leyding de ratas expuestas a 10 μg/ml de ZEA por 12 horas.

#### 4.5 Características de la muerte celular en neutrófilos polimorfonucleares por ZEA

La inducción de la apoptosis en las células polimorfonucleares (PMN) se pudo evidenciar a las 2 horas de tratamiento con ZEA a una concentración de  $6,40 \mu\text{M}$ ; de modo que se evaluó la exposición de la fosfatidilserina en la capa externa de la membrana plasmática. En el histograma de solapamiento (overlay), se obtuvo un porcentaje de positividad de la Anexina V-FITC del 67,70%, como marcador de la apoptosis temprana y se observó el desplazamiento hacia la derecha en el histograma de la señal en las células tratadas con ZEA, indicando el grado de detección y, en consecuencia, la densidad de inversión de la fosfatidilserina, en comparación con el control que presentó un porcentaje del 46,99% (figura 23).

#### Figura 23.

*Detección de la fosfatidilserina en células PMN mediante citometría de flujo por tinción con Anexina V-FITC, durante 2 horas de tratamiento con ZEA a una concentración de  $6,40 \mu\text{M}$*



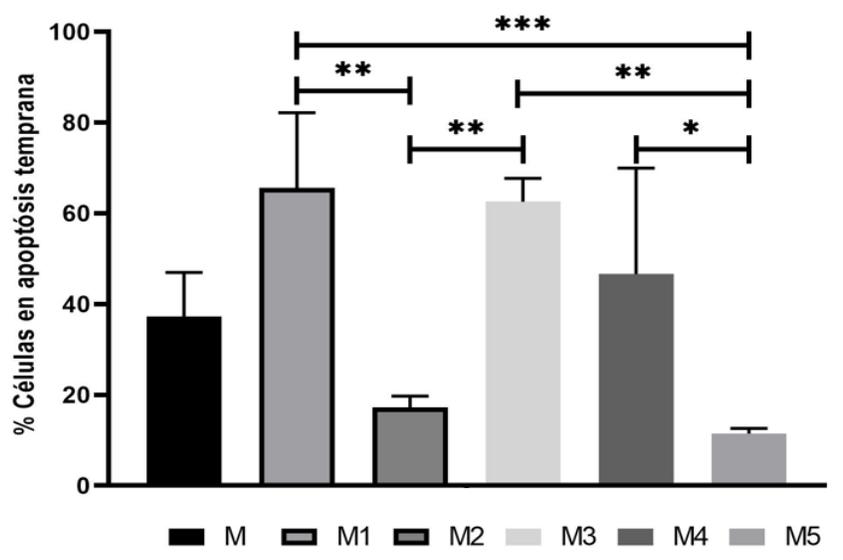
**A).** Pico gris representa el control **B).** Pico negro representa las células tratadas con ZEA. **C)** Solapamiento del control vs. células tratadas con  $6,40 \mu\text{M}$  de ZEA. El grado de unión al marcador AnexinaV/FITC fue cuantificado por citometría de flujo

En cuanto a los porcentajes obtenidos de detección de la fosfatidilserina, se pudo observar que no hubo diferencias significativas entre la muestra control y las 5 muestras

analizadas. Sin embargo, se evidenció diferencias significativas, al comparar entre sí, las muestras tratadas con ZEA (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ), por lo tanto, el efecto citotóxico entre las muestras fue muy diverso, con porcentajes mayores o cercanos al 50% para las muestras M1, M3 y M4, e inferiores al 20% para las muestras M2 y M5. No obstante, aunque se trate del mismo tipo celular, los porcentajes obtenidos variaron en gran medida, indicando que las células reaccionaron de diferente manera a la micotoxina (figura 24).

### Figura 24.

Porcentaje de células PMN positivas para Anexina V-FITC, tratadas con una concentración de 6,40  $\mu\text{M}$  de ZEA



Detección la fosfatidilserina, característica relacionada con la apoptosis temprana.

Cada barra representa la media  $DE \pm$  (n=3), versus el control usando ANOVA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

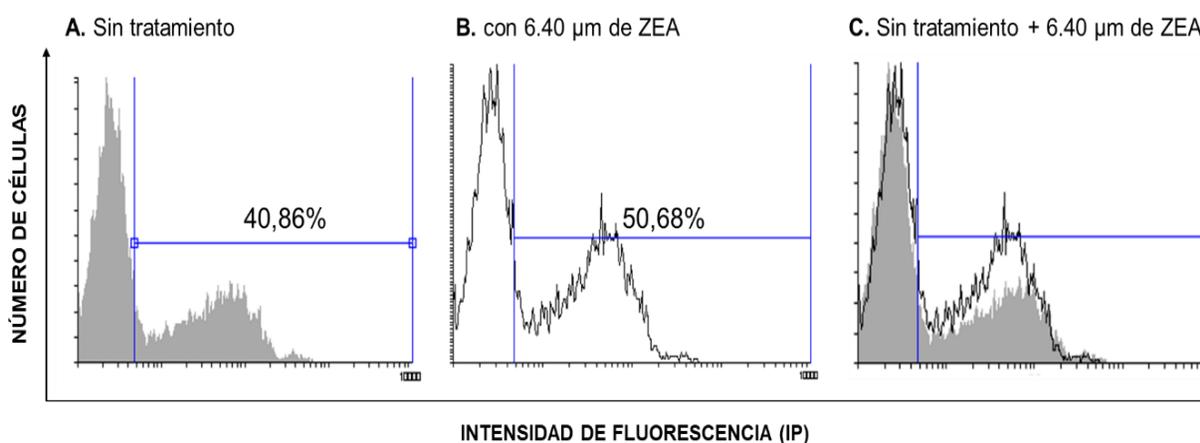
La fragmentación del ADN en las células PMN se cuantificó por citometría de flujo. En la figura 25, se evidencia el grado de incorporación del IP en las células tratadas con 6,40  $\mu\text{M}$  de ZEA, con un porcentaje de positividad del 50,68%, debido a la pérdida de la permeabilidad de la

membrana, en comparación con el control en el cual se obtuvo un porcentaje de 40,86%.

Además, conforme se desplaza hacia la derecha el histograma de señal, mayor cantidad de IP se habrá unido al ADN, siendo proporcional a la intensidad de fluorescencia emitida.

### Figura 25.

*Análisis del nivel de fragmentación del ADN en células PMN mediante citometría de flujo por tinción con yoduro de propidio (IP), durante 2 horas de tratamiento con ZEA, a una concentración de 6,40  $\mu\text{M}$*



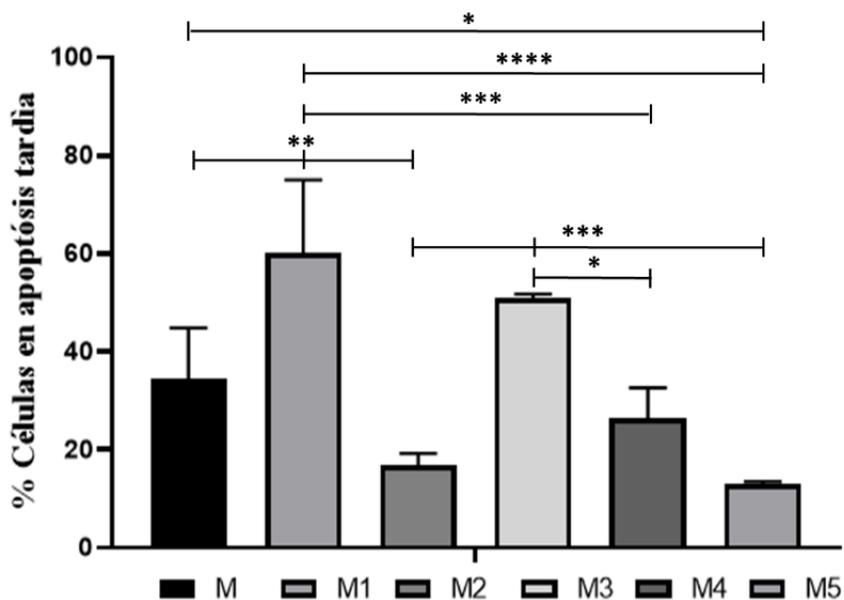
A). Pico gris representa el control B). Pico negro representa las células tratadas con ZEA C). Solapamiento del control vs. Células tratadas con 6,40  $\mu\text{M}$  de ZEA

De acuerdo con los datos obtenidos para el análisis de fragmentación de ADN; en la figura 26, se observó que las células de la muestra control, presentaron una diferencia significativa con la muestra M1 (\*\* $p < 0.01$ ) y M5 (\* $p < 0.05$ ), con porcentajes de apoptosis tardía y/o necrosis entre 60.17% y 13.09%, respectivamente, en comparación con el control (34,42%). No obstante, en la comparación entre las 5 muestras tratadas con ZEA, se obtuvo porcentajes en un rango de 50-60% para M1 y M3, con diferencias significativas muy variables

entre las demás muestras analizadas (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ), y porcentajes cercanos al 30% para M2, M4 y M5.

### Figura 26.

*Porcentaje de células PMN con fragmentación de ADN relacionada con apoptosis tardía y necrosis, tratadas con una concentración de 6,40  $\mu\text{M}$  de ZEA*



Cada barra representa la media  $DE \pm$  ( $n=3$ ), versus el control usando ANOVA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

Debido a que se realizó una tinción doble con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI), se pudo observar que las muestras M1 y M3, presentaron mayor sensibilidad a ZEA, con porcentajes de apoptosis temprana, tardía y necrosis cercanos al 50%, en comparación con los porcentajes obtenidos en las demás muestras.

Esta afirmación coincide con un estudio realizado por Richetti et al. (2003), en el cual evaluaron la actividad de 4 micotoxinas (Citrinina, Ocratoxina B, Rubratoxina B, y  $\beta$ -zearalenol) en neutrófilos, cuyo efecto en este caso, no dependió de la dosis, sino que la sensibilidad fue

estrictamente individual, ya que, con la misma dosis de las micotoxinas, se presentaron diversos efectos en las diferentes muestras de estudio.

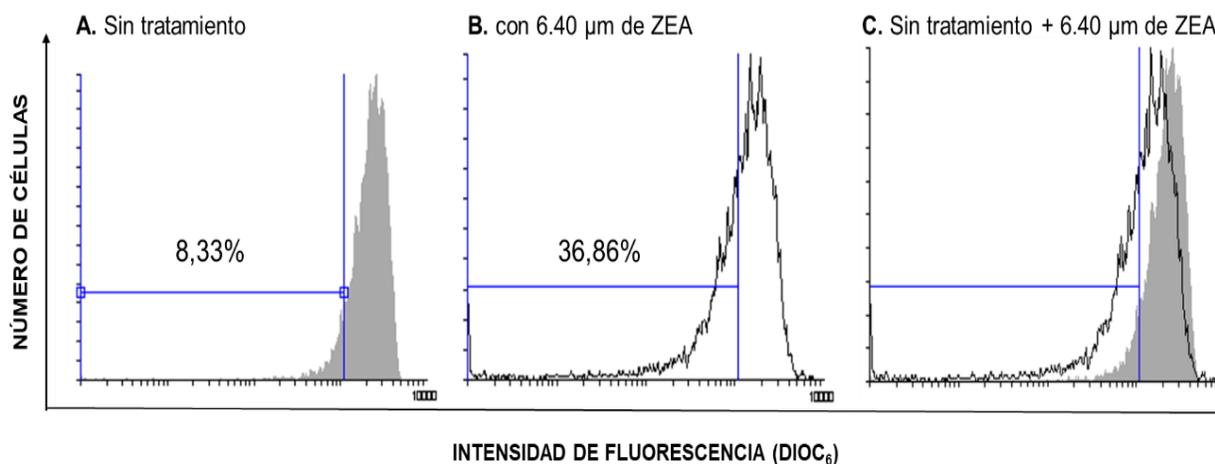
Se han reportado también, estudios sobre la determinación de la inducción de apoptosis por citometría de flujo con ZEA, los cuales varían en gran medida de los resultados obtenidos en esta investigación, ya sea por el tipo de célula, la concentración y el tiempo de exposición.

Wang et al. (2014), confirmaron que ZEA induce apoptosis al exponer las células de Leyding de ratas a 20  $\mu\text{g/ml}$  por 12 horas, en donde, el porcentaje de células que estaban en apoptosis temprana fue mayor (29.4%) a las que se encontraban en apoptosis tardía (9.2%). En contraste, Liu et al. (2018), expusieron las células granulosa porcina a ZEA durante 72 horas con concentraciones 10  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ , y obtuvieron porcentajes de apoptosis temprana entre un 0.44 - 6.91% y 1.25 - 24.71%, respectivamente; y de apoptosis tardía entre un 5.95 -13.8% y 10.07 - 41.87%, respectivamente.

Por otro lado, los cambios en el potencial de membrana mitocondrial en las células PMN, se representan como el porcentaje de células con reducción en la intensidad de fluorescencia emitida por DiOC<sub>6</sub>, siendo un indicador clave de la actividad mitocondrial dependiente del voltaje, respecto al control. En la figura 27, se compararon las intensidades de fluorescencia con el histograma de solapamiento, en el cual se evidencia un alto nivel de unión de DiOC<sub>6</sub> a las mitocondrias de las células PMN control, con porcentajes de pérdida del potencial del 8,33% y una notable disminución en la intensidad de fluorescencia en las células PMN tratadas con 6,40  $\mu\text{M}$  de ZEA, con un porcentaje de 36,86%, desplazándose hacia la izquierda en el histograma de señal, siendo esta, una característica clave en procesos de apoptosis temprana por la vía mitocondrial.

**Figura 27.**

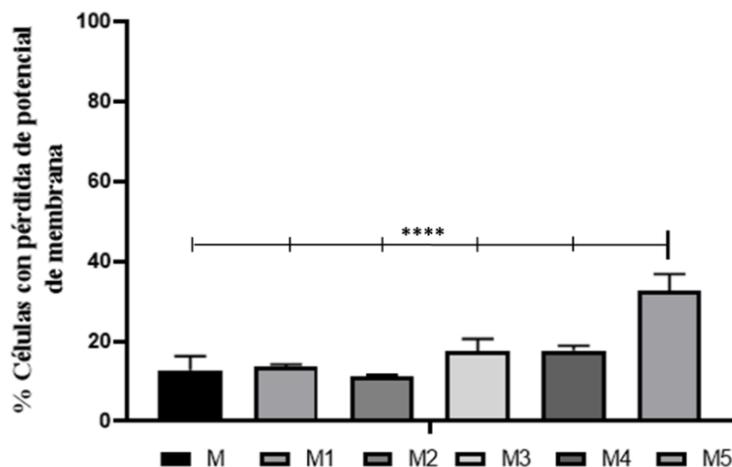
Evaluación del potencial de membrana en células PMN por tinción con DIOC6 mediante citometría de flujo durante 2 horas de tratamiento con ZEA, a una concentración de 6,40  $\mu\text{M}$



A). Pico gris representa el control B). Pico negro representa las células tratadas con ZEA. C) Solapamiento del control vs células tratadas con 6,40  $\mu\text{M}$  de ZEA

**Figura 28.**

Porcentaje de células PMN con pérdida del potencial de membrana tratadas con una concentración de 6,40  $\mu\text{M}$  de ZEA



Cada barra representa la media  $DE\pm$  (n=3), versus el control usando ANOVA. \*\*\*\*p<0,0001

Con respecto a los datos obtenidos en la figura 28, la muestra M5 presentó un porcentaje de células con pérdida del potencial de membrana de 32,69%, y diferencias significativas (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ), con todas las muestras tratadas con ZEA, incluyendo el control (12.79%), indicando que la muestra M5 tuvo una baja captación de DIOC<sub>6</sub>, lo que sugiere que se presentó pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial, que refleja el inicio de la señal proapoptótica por la vía mitocondrial.

De acuerdo a los reportes en la literatura y a los encontrados en este estudio, se puede inferir que, a pesar de haberse evaluado la misma población celular, se presentaron notables diferencias entre las 5 muestras, indicando que el efecto de las micotoxinas puede estar influenciado por la edad, sexo, raza, tipo de célula, estado inmunológico, tiempo de exposición y concentración. También se podría inferir que ZEA, puede inducir diferentes vías de señalización, debido a la variabilidad de sus efectos.

Tal es el caso de estudios realizados por Xu et al. (2016) en las células Sertoli de ratas, en donde determinaron que se incrementó la expresión de genes pro-apoptóticos característicos de cada vía de señalización, Bax/Bcl-2 y caspasa 9 (intrínseca), FasL y caspasa 8 (extrínseca) y caspasa 3; después del tratamiento con ZEA a concentraciones entre 0 -150  $\mu\text{M}$  por 24 horas, demostrando, que ZEA induce apoptosis de manera dosis-dependiente por las dos vías, intrínseca y extrínseca. En estudios previos realizados por Cai et al. (2019), en el mismo tipo de población celular, revelaron que ZEA a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  por 24 horas, redujo la transcripción y la expresión de proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas e incrementó la transcripción y expresión de proteínas pro-apoptóticas Bax, Fas, FasL, FADD, y caspasa 8.

En consecuencia, los parámetros analizados por citometría de flujo en las células permitieron determinar que la inducción de la apoptosis, fue el efecto citotóxico producido por

ZEA en las células PMN, al evaluar los eventos característicos de este proceso, como son translocación de la fosfatidilserina, fragmentación del ADN y pérdida del potencial de membrana. Los resultados obtenidos en este estudio, permitieron verificar que la exposición a ZEA, desencadena eventos morfológicos y bioquímicos, que conducen a la muerte celular por apoptosis en las células HepG<sub>2</sub>P y PMN.

## Conclusiones

Según los datos obtenidos por HPLC, se pudo concluir que en el 20 % (3 de 15) de las muestras de arroz de cultivo tomadas de los municipios de Cúcuta, Los Patios, El Zulia, y Puerto Santander, se cuantificó y se evidenció la presencia de ZEA. Estos resultados indican que existe un riesgo para la salud; ya que, la micotoxina induce diferentes efectos citotóxicos, hepatotóxicos, carcinogénicos, estrogénicos y genotóxicos, entre otros; relacionados con la muerte celular en diferentes tipos de células, por esta razón, surge la necesidad de establecer medidas preventivas por parte de los organismos de control y de esta manera, fijar valores límites máximos permitidos en alimentos como el arroz.

A partir de los resultados obtenidos por medio de análisis microbiológicos, se aisló e identificó el hongo toxigénico *Fusarium* sp., en las muestras de arroz de cultivo (M009, M010 y M011); en las cuales, se detectó y cuantificó la presencia de ZEA; por ende, es de gran importancia realizar detecciones consecutivas, tanto de las micotoxinas como del hongo, ya que la sola presencia del hongo, no implica que la micotoxina también lo esté, o en caso contrario, la ausencia del hongo, no garantiza que los alimentos estén libres de la micotoxina.

Teniendo en cuenta las características observadas con el ensayo MTT y por microscopía electrónica de transmisión, se pudo evidenciar que ZEA ejerció un efecto citotóxico sobre las células HepG<sub>2</sub>, disminuyendo la actividad metabólica, y por ende, causando un efecto antiproliferativo de manera dependiente a la concentración y al tiempo de exposición; por consiguiente, indujo cambios morfológicos relacionados con la muerte celular por apoptosis, como la reducción del volumen celular, pérdida del contacto célula-célula, condensación y

dispersión de la cromatina, formación de vesículas, fragmentación nuclear y celular, y formación de cuerpos apoptóticos.

Los resultados en este estudio, permitieron corroborar que la exposición a ZEA, desencadena una serie de cambios bioquímicos y morfológicos característicos de la muerte celular por apoptosis y/o necrosis, posiblemente por la activación jerárquica de caspasas que conduce a los diferentes cambios en la línea celular HepG<sub>2</sub> y PMN.

Por medio de la doble tinción (Anexina V-FITC /IP), se determinaron los porcentajes de células PMN que evidenciaron inversión de la fosfatidilserina y fragmentación del ADN, permitiendo la determinación del estadio de muerte celular (apoptosis temprana, apoptosis tardía y/o necrosis); en cual se encuentran las muestras analizadas posterior al tratamiento con 6,40  $\mu$ M de ZEA. Los resultados evidenciaron que las muestras M1 y M3 presentaron mayor sensibilidad al efecto de ZEA, con porcentajes cercanos al 50% en las dos tinciones.

Se analizó la pérdida del potencial de membrana mitocondrial en las células PMN tratadas con 6,40  $\mu$ M de ZEA, a partir de la reducción en la intensidad de fluorescencia del marcador DiOC<sub>6</sub>, como un indicador esencial de la función mitocondrial; con un porcentaje de 32,69% para la muestra M5, evidenciando, baja captación de DiOC<sub>6</sub> y por ende pérdida en la integridad de la membrana.

## **Recomendaciones**

Se requiere la búsqueda de estrategias de prevención para el desarrollo de hongos toxigénicos en alimentos de mayor consumo en la región, implementando programas de vigilancia, seguimiento, control y monitoreo de las condiciones de almacenamiento de los granos, bajo las directrices de los organismos de control como el INVIMA, y el ICA, orientados al desarrollo de las Buenas Prácticas Agrícolas.

Continuar con el desarrollo de estudios relacionados con la presencia de micotoxinas en alimentos de consumo humano, para que se puedan definir políticas de salud pública y poder establecer valores permisibles.

Se recomienda que los resultados obtenidos en este trabajo, sean el punto de partida para continuar con estudios de las proteínas implicadas en las diferentes vías de señalización del proceso apoptótico y realizar ensayos que permitan determinar que otros tipos de muerte celular están relacionados con la citotoxicidad de ZEA.

## Referentes Bibliográficos

- Abbas, HK; Cartwright, RD; Xie, W; Mirocha, CJ; Richard, JL; Dvorak, TJ; Sciumbato, GL y Shier, WT. (1999). Mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolates from rice with *Fusarium sheath rot* disease. *Mycopathologia*, 147(2): 97-104. <https://doi.org/10.1023/a:1007147813326>
- Abbas, S; Murtaza, S; Aslam, F; Khawar, A; Rafique, S y Naheed, S. (2011). Effect of Processing on Nutritional Value of Rice (*Oryza sativa*). *World J. Med. Sci.*, 6.
- Abbès, S; Ouanes, Z; Salah-Abbès, JB; Abdel-Wahhab, MA; Oueslati, R y Bacha, H. (2007). Preventive role of aluminosilicate clay against induction of micronuclei and chromosome aberrations in bone-marrow cells of Balb/c mice treated with Zearalenone. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631(2), 85-92. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.01.012>
- Abid-Essefi, S; Baudrimont, I; Hassen, W; Ouanes, Z; Mobio, TA; Anane, R; Creppy, EE y Bacha, H. (2003). DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: Prevention by Vitamin E. *Toxicology*, 192(2-3), 237-248. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(03\)00329-9](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(03)00329-9)
- Abid-Essefi, S; Ouanes, Z; Hassen, W; Baudrimont, I, Creppy, E y Bacha, H. (2004). Cytotoxicity, inhibition of DNA and protein syntheses and oxidative damage in cultured cells exposed to zearalenone. *Toxicology in Vitro*, 18(4). pp. 467-474. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.12.011>
- Abrunhosa, L; Morales, H; Soares, C; Calado, T; Vila-Chã, AS; Pereira, M y Venâncio, A. (2016). A Review of Mycotoxins in Food and Feed Products in Portugal and Estimation of

- Probable Daily Intakes. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(2), 249-265.  
<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.720619>
- Adibnia, E; Razi, M y Malekinejad, H. (2016). Zearalenone and 17  $\beta$ -estradiol induced damages in male rats reproduction potential; evidence for ER $\alpha$  and ER $\beta$  receptors expression and steroidogenesis. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 120, 133-146. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.009>
- Albores, LC; Baños, SB; Herrera, JM; Necha, LB; López, MH y Hernández, AC. (2014). Morphological and molecular characterization of pathogenic isolates of *Fusarium* spp. Obtained from gladiolus corms and their sensitivity to *Jatropha curcas* L. oil. *African Journal of Microbiology Research*, 8(8), 724-733.  
<https://doi.org/10.5897/AJMR2013.6413>
- Alcaldía Municipal de San José de Cúcuta. (8 de diciembre de 2017). *Nuestro municipio*.  
<http://www.cucuta-nortedesantander.gov.co/municipio/nuestro-municipio>
- Alcaldía municipal de El Zulia. (16 de mayo de 2018) *Nuestro municipio*. <http://www.elzulia-nortedesantander.gov.co/municipio/nuestro-municipio>
- Alcaldía de Puerto Santander. (26 de junio de 2018). *Nuestro municipio*.  
<http://www.puertasantander-nortedesantander.gov.co/municipio/nuestro-municipio>
- Aldana, A. (2001). Enciclopedia agropecuaria. Producción Agrícola. 2 ed. Bogotá D. C.: Terranova. p. 304-306.
- Alshannaq, A y Yu, JH. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632.  
<https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>

- Amarante-Mendes, GP; Finucane, DM; Martin, SJ; Cotter, TG; Salvesen, GS y Green, DR. (1998). Anti-apoptotic oncogenes prevent caspase-dependent and independent commitment for cell death. *Cell Death & Differentiation*, 5(4), 298-306. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400354>
- Amirahmadi, M; Shoeibi, S; Rastegar, H; Elmi, M y Mousavi Khaneghah, A. (2018). Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure. *Toxin Reviews*, 37(3), 187-195. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1354306>
- Arur, S; Uche, UE; Rezaul, K; Fong, M; Scranton, V; Cowan, AE; Mohler, W y Han, DK. (2003). Annexin I Is an Endogenous Ligand that Mediates Apoptotic Cell Engulfment. *Developmental Cell*, 4(4), 587-598. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00090-X)
- Ashkenazi, A y Dixit, VM. (1998). Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1305>
- Aupanun, S; Phuektes, P; Poapolathep, S; Sutjarit, S; Giorgi, M y Poapolathep, A. (2016). Apoptosis and gene expression in Jurkat human T cells and lymphoid tissues of fusarenon-X-treated mice. *Toxicon*, 123, 15-24. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.10.012>
- Ayed-Boussema, I; Bouaziz, C; Rjiba, K; Valenti, K; Laporte, F; Bacha, H y Hassen, W. (2008). The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway. *Toxicology in Vitro*, 22(7). pp. 1671-1680. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.06.016>
- Banjerdpongchai, R; Kongtawelert, P; Khantamat, O; Srisomsap, C; Chokchaichamnankit, D; Subhasitanont, P y Svasti, J. (2010). Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress

- pathways cooperate in zearalenone-induced apoptosis of human leukemic cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 3(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-3-50>
- Battistelli, M y Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Ben Salah-Abbès, J; Belgacem, H; Ezzdini, K; Abdel-Wahhab, MA y Abbès, S. (2020). Zearalenone nephrotoxicity: DNA fragmentation, apoptotic gene expression and oxidative stress protected by *Lactobacillus plantarum* MON03. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 175, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.12.004>
- Ben, Salem, I; Prola, A; Boussabbeh, M; Guilbert, A; Bacha, H; Abid-Essefi, S y Lemaire, C. (2015). Crocin and Quercetin protect HCT116 and HEK293 cells from Zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress. *Cell Stress and Chaperones*, 20(6). pp.927-938. <https://doi.org/10.1007/s12192-015-0613-0>
- Bennett, JW y Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), pp. 497-516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Blond-Elguindi, S; Fourie, AM; Sambrook, JF y Gething, MJ. (1993). Peptide-dependent stimulation of the ATPase activity of the molecular chaperone BiP is the result of conversion of oligomers to active monomers. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12730-12735. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)31449-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)31449-2)
- Boersma, HH; Bennaghmouch, A; Hofstra, L; Narula, J; Heidendal, G K y Reutelingsperger, C. P. M. (s. f.). *Past, Present, and Future of Annexin A5: From Protein Discovery to Clinical Applications*. 16.

- Boersma, HH; Kietselaer, BL; Stolk, LM; Bennaghmouch, A; Hofstra, L; Narula, J y Reutelingsperger, CP. (2005). Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *Journal of nuclear medicine*, 46(12), 2035-2050.
- Booth, C. (1977). *Fusarium: Laboratory guide to the identification of the major species*. Commonwealth Mycological Institute.
- Bossy-Wetzel, E y Green, DR. (2000). Assays for cytochrome c release from mitochondria during apoptosis. *Methods in Enzymology*, 322, 235-242. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)22024-7](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)22024-7)
- Bottalico, A. (1998). Fusarium diseases of cereals: species complex and related mycotoxin profiles, in Europe. *Journal of Plant Pathology*, 80(2). pp. 85-103.
- Bouaziz, C; Sharaf el Dein, O; Martel, C; Golli, EE, Abid-Essefi, S; Brenner, C; Lemaire, C y Bacha, H. (2011). Molecular events involved in ochratoxin A induced mitochondrial pathway of apoptosis, modulation by Bcl-2 family members. *Environmental Toxicology*, 26(6), 579-590. <https://doi.org/10.1002/tox.20581>
- Branzei, D y Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(4). pp. 297-308. <https://doi.org/10.1038/nrm2351>
- Breckenridge, DG; Germain, M; Mathai, JP; Nguyen, M y Shore, GC. (2003). Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*, 22(53), 8608-8618. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207108>
- Broom, L. (2015). Mycotoxins and the intestine. *Animal Nutrition*, 1(4), 262-265. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2015.11.001>

- Bryden, WL. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1), 134-158. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014>
- Cai, G; Si, M; Li, X; Zou, H; Gu, J; Yuan, Y; Liu, X; Liu, Z y Bian, J. (2019). Zearalenone induces apoptosis of rat Sertoli cells through Fas-Fas ligand and mitochondrial pathway. *Environmental Toxicology*, 34(4), 424-433. <https://doi.org/10.1002/tox.22696>
- Cai, G; Sun, K; Xia, S; Feng, Z; Zou, H; Gu, J, Yuan, Y; Zhu, J., Liu, Z., y Bian, J. (2020). Decrease in immune function and the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) overactivation in apoptosis during T lymphocytes activation induced by zearalenone, deoxynivalenol, and their combinations. *Chemosphere*, 255, 126999. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126999>
- Cao, SS, y Kaufman, RJ. (2014). Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, 21(3), 396-413. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5851>
- Carlson, MP y Ensley, SM. (2003). *Sampling and Analyzing Feed for Fungal (Mold) Toxins (Mycotoxins)*. 4.
- Carlson, MP y Ensley, SM. (2003). *Sampling and analyzing feed for fungal (mold) toxins (mycotoxins)*. Lincoln, NE, USA: Cooperative Extension, Institute of Agriculture and Natural Resources, University of Nebraska-Lincoln.
- Chandravarnan, P; Agyei, D y Ali, A. (2022). Green and sustainable technologies for the decontamination of fungi and mycotoxins in rice: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 124, 278-295. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.020>

- Channaiah, L y Maier, D. (2014). *Best Stored Maize Management Practices for the Prevention of Mycotoxin Contamination*. Capítulo 6. p. 78-88. <https://doi.org/10.1002/9781118832790>
- Charoenpornsook, K; Fitzpatrick, JL y Smith, JE. (1998). The effects of four mycotoxins on the mitogen stimulated proliferation of bovine peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Mycopathologia*, 143(2), 105-111. <https://doi.org/10.1023/A:1006971724678>
- Chen, F; Li, Q; Zhang, Z; Lin, P; Lei, L; Wang, A Jin, Y. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Cooperates in Zearalenone-Induced Cell Death of RAW 264.7 Macrophages. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 19780-19795. <https://doi.org/10.3390/ijms160819780>
- Chen, Q; Thompson, J; Hu, Y; Das, A y Lesnefsky, EJ. (2019). Cardiac Specific Knockout of p53 Decreases ER Stress-Induced Mitochondrial Damage. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcvm.2019.00010>
- Chen, Q; Takeyama, N; Brady, G; Watson, AJ y Dive, C. (1998). Blood cells with reduced mitochondrial membrane potential and cytosolic cytochrome C can survive and maintain clonogenicity given appropriate signals to suppress apoptosis. *Blood*, 92(12), 4545-4553
- Chinnaiyan, AM. (1999). The apoptosome: Heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 1(1), 5-15. <https://doi.org/10.1038/sj.neo.7900003>
- Consejo Ejecutivo, 110. (2002). *Informe sobre las reuniones de los comités de expertos y los grupos de estudio: Informe de la Secretaría* (EB110/6). Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/81563>
- Cook, SA y Poole-Wilson, PA. (1999). Cardiac myocyte apoptosis. *European Heart Journal*, 20(22), 1619-1629. <https://doi.org/10.1053/euhj.1999.1548>

- Crowley, LC; Marfell, BJ; Scott, AP y Waterhouse, NJ. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), pdb.prot087288. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- C.S Reddy, Reddy, KRN; N.R.Kumar, y Muralidharan, K. (2004). Exploration aflatoxin contamination and its management in rice grains. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 34, 816-820.
- Cúcuta nuestra. (s.f.). *Los Patios Norte de Santander*. <https://www.cucutanuestra.com/tema/geografia/municipios/region-centro/los-patios/los-patios.htm>
- D'Arcy, MS. (2019). Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Daou, R; Joubrane, K; Maroun, RG; Khabbaz, LR; Ismail, A; Khoury, AE; Daou, R; Joubrane, K; Maroun, R G; Khabbaz, L. R., Ismail, A., y Khoury, A. E. (2021). Mycotoxins: Factors influencing production and control strategies. *AIMS Agriculture and Food*, 6(1), 416-447. <https://doi.org/10.3934/agrfood.2021025>
- DANE (2017). Características que se destacan en el cultivo de arroz secano (*Oryza Sativa L.*) en Colombia. Boletín mensual insumos y factores asociados a la producción agropecuaria n°58. disponible en: [https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/bol\\_insumos\\_abr\\_2017.pdf](https://www.dane.gov.co/files/investigaciones/agropecuario/sipsa/bol_insumos_abr_2017.pdf), fecha de consulta 8-05-2020

- Darbre, P; Byford, R; Shaw, L; Horton, R; Pope, G y Sauer, M. (2002). Oestrogenic activity of isobutylparaben in vitro and in vivo. *Journal of applied toxicology : JAT*, 22, 219-226. <https://doi.org/10.1002/jat.860>
- Darzynkiewicz, Z; Galkowski, D y Zhao, H. (2008). Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44(3), 250-254. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.11.008>
- Demchenko, AP. (2013). Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. *Cytotechnology*, 65(2), 157-172. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9481-y>
- Díaz, M; Herrero, M; García, LA y Quirós, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 385-407. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.013>
- D'Mello, JPF; Placinta, CM. y Macdonald, AMC. (1999). Fusarium mycotoxins: A review of global implications for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and Technology*, 80(3). pp.183-205. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(99\)00059-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(99)00059-0)
- Dors, G. C., Bierhals, V. da S., y Badiale-Furlong, E. (2011). Parboiled rice: Chemical composition and the occurrence of mycotoxins. *Food Science and Technology*, 31, 172-177
- Du, C; Fang, M; Li, Y; Li, L y Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102(1), 33-42. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00008-8)
- Duarte-Vogel, S y Villamil-Jiménez, LC. (2006). Micotoxinas en la Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, 8(1), pp. 129-135. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642006000400011>

Edinger, AL y Thompson, CB. (2004). Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), 663-669.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>

Da Rocha, M. E. B., Freire, F. D. C. O., Maia, F. E. F., Guedes, M. I. F., & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1), 159-165.

Eguchi, Y; Shimizu, S y Tsujimoto, Y. (1997). Intracellular ATP Levels Determine Cell Death Fate by Apoptosis or Necrosis1. *Cancer Research*, 57(10), 1835-1840

El Golli Bennour, E; Bouaziz, C, Ladjimi, M, Renaud, P y Bacha, H. (2009). Comparative mechanisms of zearalenone and ochratoxin A toxicities on cultured HepG2 cells: Is oxidative stress a common process? *Environmental Toxicology*, 24(6), 538-548.  
 https://doi.org/10.1002/tox.20449

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

Escobar, ML; Echeverría, OM y Vázquez-Nin, GH. (2015). Necrosis as Programmed Cell Death. En *Cell Death—Autophagy, Apoptosis and Necrosis*. IntechOpen.  
<https://doi.org/10.5772/61483>

FAO - 28ª Conferencia Regional De La FAO Para América Latina y El Caribe. (s. f.). Recuperado 10 de julio de 2022, de <https://www.fao.org/3/J1225s/J1225s00.htm>

Fedearroz (1998). Censo Nacional Arrocerero. Cubrimiento cosecha. Fondo nacional del arroz - División de investigaciones económicas 2(B). pp.167-197

Fedearroz. (2012). El clima y el cultivo del arroz en Norte de Santander. Revista de arroz. Cúcuta. En: FEDEARROZ. 2012, Vol. 60, No. 497.

- Feng, N; Wang, B; Cai, P; Zheng, W; Zou, H; Gu, J; Yuan, Y; Liu, X; Liu, Z y Bian, J. (2020). ZEA-induced autophagy in TM4 cells was mediated by the release of Ca<sup>2+</sup> activates CaMKK $\beta$ -AMPK signaling pathway in the endoplasmic reticulum. *Toxicology Letters*, 323, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.01.010>
- Fleisher, TA y Oliveira, JB. (2019). 92—Flow Cytometry. En R. R. Rich, T. A. Fleisher, W. T. Shearer, H. W. Schroeder, A. J. Frew, y C. M. Weyand (Eds.), *Clinical Immunology (Fifth Edition)* (pp. 1239-1251.e1). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6896-6.00092-2>
- Gaffoor, I., y Trail, F. (2006). Characterization of Two Polyketide Synthase Genes Involved in Zearalenone Biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1793-1799. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1793-1799.2006>
- Formigli, L; Papucci, L; Tani, A; Schiavone, N; Tempestini, A; Orlandini, GE; Capaccioli, S y Zecchi Orlandini, S. (2000). Aponecrosis: Morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *Journal of Cellular Physiology*, 182(1), 41-49. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200001\)182:1<41::AID-JCP5>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200001)182:1<41::AID-JCP5>3.0.CO;2-7)
- Gaffoor, I., y Trail, F. (2006). Characterization of Two Polyketide Synthase Genes Involved in Zearalenone Biosynthesis in *Gibberella zeae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1793-1799. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1793-1799.2006>
- García, P. M. (2010). *Análisis de factores eco-fisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de fusarium* [Http://purl.org/dc/dcmitype/Text, Universidad Complutense de Madrid]. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=196234>
- Garzón-González, HD; Jaimes-Méndez, N; Rojas-Contreras, L; Salmen-Halabi, S y Gil-Durán, MA. (2021). Efecto citotóxico de Deoxinivalenol sobre la proliferación de la línea celular HepG2. *Revista MVZ Córdoba*, 26(3), e2080-e2080. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2080>

- Gasser, JP; Hehl, M y Millward, TA. (2009). A homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assay for phosphatidylserine exposure on apoptotic cells. *Analytical Biochemistry*, 384(1), 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.09.016>
- Gavrieli, Y; Sherman, Y y Ben-Sasson, SA. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology*, 119(3), 493-501. <https://doi.org/10.1083/jcb.119.3.493>
- Gazzah, AC; Camoin, L; Abid, S; Bouaziz, C; Ladjimi, M y Bacha, H. (2013). Identification of proteins related to early changes observed in Human hepatocellular carcinoma cells after treatment with the mycotoxin Zearalenone. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie*, 65(6), 809-816. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2012.11.007>
- Gazzah, AC; El Golli Bennour, E; Bouaziz, C; Abid, S; Ladjimi, M y Bacha, H. (2010). Sequential events of apoptosis induced by zearalenone in cultured hepatocarcinoma cells. *Mycotoxin Research*, 26(3), 187-197. <https://doi.org/10.1007/s12550-010-0053-8>
- Gimeno, A y Martins, ML. (2011). *Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos. Special Nutrients, Florida*, 50-53.
- Golge, O y Kabak, B. (2020). Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals and cereal products from Turkey. *Food Control*, 110, 106982. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106982>
- Graham, L y Orenstein, JM. (2007). Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nature Protocols*, 2(10), 2439-2450. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.304>

- Green, DR y Reed, JC. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science*, 281(5381), 1309-1312.  
<https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1309>
- Grimsley, C y Ravichandran, KS. (2003). Cues for apoptotic cell engulfment: Eat-me, don't eat-me and come-get-me signals. *Trends in Cell Biology*, 13(12), 648-656.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2003.10.004>
- Gromadzka, K; Waskiewicz, A; Chelkowski, J y Golinski, P. (2008). Zearalenone and its metabolites: Occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1(2). pp.209-220. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.x015>
- Gross, A; Yin, XM; Wang, K; Wei, MC; Jockel, J; Milliman, C; Erdjument-Bromage, H; Tempst, P y Korsmeyer, SJ. (1999). Caspase Cleaved BID Targets Mitochondria and Is Required for Cytochrome c Release, while BCL-XL Prevents This Release but Not Tumor Necrosis Factor-R1/Fas Death \*. *Journal of Biological Chemistry*, 274(2), 1156-1163.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.274.2.1156>
- Gupta, RC; Mostrom, MS y Evans, TJ. (2018). Chapter 76—Zearalenone. En R. C. Gupta (Ed.), *Veterinary Toxicology (Third Edition)*. pp. 1055-1063. Academic Press.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00076-3>
- Hadiani, MR; Yazdanpanah, H; Ghazi-Khansari, MM. Cheraghali, A y Goodarzi, M. (2003). Survey of the natural occurrence of zearalenone in maize from northern Iran by thin-layer chromatography densitometry. *Food Additives & Contaminants*, 20(4), 380-385.  
<https://doi.org/10.1080/0265203031000087968>
- Han, Y y Lo, YH. (2015). Imaging Cells in Flow Cytometer Using Spatial-Temporal Transformation. *Scientific Reports*, 5(1), 13267. <https://doi.org/10.1038/srep13267>

- Hansen, FT; Sørensen, JL; Giese, H; Sondergaard, TE y Frandsen, RJN. (2012). Quick guide to polyketide synthase and nonribosomal synthetase genes in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.018>
- Hartley, A; Stone, JM; Heron, C; Cooper, JM y Schapira, AHV. (1994). Complex I Inhibitors Induce Dose-Dependent Apoptosis in PC12 Cells: Relevance to Parkinson's Disease. *Journal of Neurochemistry*, 63(5), 1987-1990. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63051987.x>
- Hassan, M; Watari, H; AbuAlmaaty, A; Ohba, Y y Sakuragi, N. (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International*. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=23146133&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA427021940&sid=googleScholar&linkaccess=abs>
- Hassen, W; El Golli, E; Baudrimont, I; Mobio, AT; Ladjimi, MM; Creppy, EE y Bacha, H. (2005). Cytotoxicity and Hsp 70 induction in Hep G2 cells in response to zearalenone and cytoprotection by sub-lethal heat shock. *Toxicology*, 207(2), 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.10.001>
- Heatwole, VM. (1999). TUNEL Assay for Apoptotic Cells. En L. C. Javois, *Immunocytochemical Methods and Protocols* (Vol. 115, pp. 141-148). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-213-9:141>
- Hengartner, MO. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805), 770-776. <https://doi.org/10.1038/35037710>
- Hingorani, R; Deng, J; Elia, J; McIntyre, C y Mittar, D. (2011). Detection of apoptosis using the BD annexin V FITC assay on the BD FACSVerser<sup>TM</sup> system. *BD Biosciences, San Jose*, 1-12.

- Hirsch, T; Marchetti, P; Susin, SA; Dallaporta, B; Zamzami, N; Marzo, I; Geuskens, M y Kroemer, G. (1997). The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, 15(13), 1573-1581. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201324>
- Hong, M., Li, J., Li, S., y M. Almutairi, M. (2019). Acetylshikonin Sensitizes Hepatocellular Carcinoma Cells to Apoptosis through ROS-Mediated Caspase Activation. *Cells*, 8(11), 1466. <https://doi.org/10.3390/cells8111466>
- Hongmei, Z. (2012). *Extrinsic and Intrinsic Apoptosis Signal Pathway Review*. En Apoptosis and medicine. Capitulo I. <https://doi.org/10.5772/50129>
- Howard Shapiro M.. (2003). Parameters and Probes. En *Practical Flow Cytometry* (pp. 273-410). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0471722731.ch7>
- Hsu, H; Xiong, J y Goeddel, DV. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF- $\kappa$ B activation. *Cell*, 81(4), 495-504. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90070-5)
- Hu, J; Xu, M; Dai, Y; Ding, X; Xiao, C; Ji, H y Xu, Y. (2016). Exploration of Bcl-2 family and caspases-dependent apoptotic signaling pathway in Zearalenone-treated mouse endometrial stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(4), 553-559. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.161>
- Hu, H; Tian, M; Ding, C y Yu, S. (2019). The C/EBP Homologous Protein (CHOP) Transcription Factor Functions in Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis and Microbial Infection. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03083>

- IARC (2012). Fungi Producing Significant Mycotoxins; *IARC Scientific Publications*, 158, 1-30.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23477193/>
- Ibáñez-Vea, M; Martínez, R; González-Peñas, E; Lizarraga, E y López de Cerain, A. (2011). Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market. *Food Control*, 22(12), 1949-1955. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.008>
- Igney, FH y Krammer, PH. (2002). Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, 2(4), 277-288. <https://doi.org/10.1038/nrc776>
- Iqbal, SZ; Nisar, S; Asi, MR y Jinap, S. (2014). Natural incidence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in chicken meat and eggs. *Food Control*, 43, pp. 98-103.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.046>
- Iurlaro, R y Muñoz-Pinedo, C. (2016). Cell death induced by endoplasmic reticulum stress. *The FEBS Journal*, 283(14), 2640-2652. <https://doi.org/10.1111/febs.13598>
- Jaimés, N; Salmen, S; Colmenares, MC; Burgos, AE; Tamayo, L; Mendoza, RV y Cantor, A. (2016). Cytotoxic effect of palladium (II) inclusion compounds in beta-cyclodextrin. *Biomédica*, 36(4), 603. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.2880>
- Jee, Y; Noh, EM; Cho, ES y Son, HY. (2010). Involvement of the Fas and Fas ligand in testicular germ cell apoptosis by zearalenone in rat. *Journal of Veterinary Science*, 11(2), 115-119.  
<https://doi.org/10.4142/jvs.2010.11.2.115>
- Jin, H; Yin, S; Song, X; Zhang, E; Fan, L y Hu, H. (2016). P53 activation contributes to patulin-induced nephrotoxicity via modulation of reactive oxygen species generation. *Scientific Reports*, 6(1), 24455. <https://doi.org/10.1038/srep24455>
- Jin, Z y El-Deiry, WS. (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biology & Therapy*, 4(2), 147-171. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.2.1508>

- Johnstone, RW; Ruefli, AA y Lowe, SW. (2002). Apoptosis: A Link between Cancer Genetics and Chemotherapy. *Cell*, 108(2), 153-164. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00625-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00625-6)
- Julian, L y Olson, MF. (2015). Apoptotic membrane dynamics in health and disease. *Cell Health and Cytoskeleton*, 2015(7), 133-142. <https://doi.org/10.2147/CHC.S57893>
- Kamiloglu, S; Sari, G; Ozdal, T y Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kamp, DW; Liu, G; Cheresch, P; Kim, SJ; Mueller, A; Lam, AP; Trejo, H; Williams, D; Tulasiram, S; Baker, M; Ridge, K; Chandel, NS y Beri, R. (2013). Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. The role of endoplasmic reticulum stress response. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(6), 892-901. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2013-0053OC>
- Karaman, EF; Zeybel, M y Ozden, S. (2020). Evaluation of the epigenetic alterations and gene expression levels of HepG2 cells exposed to zearalenone and  $\alpha$ -zearalenol. *Toxicology Letters*, 326, 52-60. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.02.015>
- Kerr, J. FR; Wyllie, AH y Currie, AR. (1972). Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239-257.
- Kharayat, BS y Singh, Y. (2018). Chapter 13 - Mycotoxins in Foods: Mycotoxicoses, Detection, and Management. En A. M. Holban y A. M. Grumezescu (Eds.), *Microbial Contamination and Food Degradation* (pp. 395-421). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00013-5>
- Khodaei, D., Javanmardi, F., y Khaneghah, A. M. (2021). The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: A three-year survey. *Current Opinion in Food Science*, 39, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.012>

- Kim, JE; Son, H y Lee, YW. (2018). Biosynthetic mechanism and regulation of zearalenone in *Fusarium graminearum*. *JSM Mycotoxins*, 68, 1-6. <https://doi.org/10.2520/myco.68-1-2>
- Kim, YT; Lee, YR; Jin, J; Han, KH; Kim, H; Kim, JC; Lee, T; Yun, SH y Lee, YW. (2005). Two different polyketide synthase genes are required for synthesis of zearalenone in *Gibberella zeae*. *Molecular Microbiology*, 58(4), 1102-1113. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04884.x>
- Kischkel, FC; Hellbardt, S; Behrmann, I; Germer, M; Pawlita, M; Krammer, PH y Peter, ME. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, 14(22), 5579-5588. doi <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb00245.x>
- Kiš, M; Vulić, A; Kudumija, N; Šarkanj, B; Jaki Tkalec, V; Aladić, K; Škrivanko, M; Furmeg, S y Pleadin, J. (2021). A Two-Year Occurrence of *Fusarium* T-2 and HT-2 Toxin in Croatian Cereals Relative of the Regional Weather. *Toxins*, 13(39), pp. 1-12. <https://doi.org/10.3390/toxins13010039>
- Knutsen, H; Alexander, J; Barregård, L; Bignami, M; Brüschweiler, B; Ceccatelli, S; Cottrill, B; Dinovi, M; Edler, L; Grasl-Kraupp, B; Hogstrand, C; Hoogenboom, L; Nebbia, C; Petersen, A; Rose, M; Roudot, AC; Schwerdtle, T; Vleminckx, C; Vollmer, G y Oswald, I. (2017). Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed. *EFSA Journal*, 15. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4851>
- Kondratskyi, A; Kondratska, K; Skryma, R y Prevarskaya, N. (2015). Ion channels in the regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1848(10, Part B), 2532-2546. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.030>

- Kouadio, JH; Mobio, TA; Baudrimont, I; Moukha, S; Dano, SD y Creppy, EE. (2005). Comparative study of cytotoxicity and oxidative stress induced by deoxynivalenol, zearalenone or fumonisin B1 in human intestinal cell line Caco-2. *Toxicology*, 213(1-2), 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.05.010>
- Kovalsky Paris, MP; Schweiger, W; Hametner, C; Stückler, R; Muehlbauer, GJ; Varga, E; Krska, R; Berthiller, F y Adam, G. (2014). Zearalenone-16-O-glucoside: A new masked mycotoxin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(5), 1181-1189. <https://doi.org/10.1021/jf405627d>
- Kowalska, K; Habrowska-Górczyńska, DE; Domińska, K y Piastowska-Ciesielska, AW. (2017). The dose-dependent effect of zearalenone on mitochondrial metabolism, plasma membrane permeabilization and cell cycle in human prostate cancer cell lines. *Chemosphere*, 180, 455-466. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.027>
- Kowalska, K; Habrowska-Górczyńska, DE; Urbanek, KA; Domińska, K; Sakowicz, A y Piastowska-Ciesielska, AW. (2019). Estrogen receptor  $\beta$  plays a protective role in zearalenone-induced oxidative stress in normal prostate epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 172, 504-513. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.115>
- Kroemer, G; Galluzzi, L y Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological Reviews*, 87(1), 99-163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00013.2006>
- Kroemer, G; El-Deiry, WS; Golstein, P; Peter, ME; Vaux, D; Vandenabeele, P; Zhivotovsky, B; Blagosklonny, MV; Malorni, W; Knight, RA; Piacentini, M; Nagata, S y Melino, G. (2005). Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death & Differentiation*, 12(2), 1463-1467. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401724>

- Kroemer, G; Zamzami, N y Susin, SA. (1997). Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today*, 18(1), 44-51. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(97\)80014-X](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)80014-X)
- Kumar, GV; Kumar, MA y Kumar, GR. (2010). Growth characteristics of *Fusarium* spp. Causing wilt disease in *Psidium guajava* L. in India. *Journal of Plant Protection Research*, 50(4), 452-462. <https://doi.org/10.2478/v10045-010-0076-3>
- Kunishige, K; Kawate, N; Inaba, T y Tamada, H. (2017). Exposure to Zearalenone During Early Pregnancy Causes Estrogenic Multitoxic Effects in Mice. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 24(3), 421-427. <https://doi.org/10.1177/1933719116657194>
- Kupcsik, L. (2011). Estimation of Cell Number Based on Metabolic Activity: The MTT Reduction Assay. En M. J. Stoddart (Ed.), *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols* (pp. 13-19). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_3)
- Langerak, P y Russell, P. (2011). Regulatory networks integrating cell cycle control with DNA damage checkpoints and double-strand break repair. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1584), 3562-3571. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0070>
- Lecomte, S; Lelong, M; Bourguine, G; Efstathiou, T; Saligaut, C y Pakdel, F. (2017). Assessment of the potential activity of major dietary compounds as selective estrogen receptor modulators in two distinct cell models for proliferation and differentiation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 325, 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.04.005>
- Lee, H; Kang, C; Yoo, YS; Hah, DY; Kim, CH; Kim, E y Kim, JS. (2013). Cytotoxicity and the induction of the stress protein Hsp 70 in Chang liver cells in response to zearalenone-induced oxidative stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 732-740. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.005>

- Lee, HJ; Oh, SY y Jo, I. (2021). Zearalenone Induces Endothelial Cell Apoptosis through Activation of a Cytosolic Ca<sup>2+</sup>/ERK1/2/p53/Caspase 3 Signaling Pathway. *Toxins*, 13(3), 187. <https://doi.org/10.3390/toxins13030187>
- Lee, R; Kim, DW; Lee, WY y Park, HJ. (2022). Zearalenone Induces Apoptosis and Autophagy in a Spermatogonia Cell Line. *Toxins*, 14(2), 148. <https://doi.org/10.3390/toxins14020148>
- Lemasters, JJ; Qian, T; He, L; Kim, JS; Elmore, SP; Cascio, WE y Brenner, DA. (2002). Role of Mitochondrial Inner Membrane Permeabilization in Necrotic Cell Death, Apoptosis, and Autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, 4(5), 769-781. <https://doi.org/10.1089/152308602760598918>
- Leslie, JF y Summerell, BA. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Wiley-Blackwell. <http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=70f83b94eb30227f954e619e539ba244>
- Lin, L; Zhang, J; Wang, P; Wang, Y y Chen, J. (1998). Thin-layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *Journal of Chromatography A*, 815(1), 3-20. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00204-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00204-0)
- Lioi, MB; Santoro, A; Barbieri, R; Salzano, S y Ursini, MV. (2004). Ochratoxin A and zearalenone: A comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutation Research*, 557(1). pp.19-27. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.09.009>
- Liu, J y Applegate, T. (2020). Zearalenone (ZEN) in Livestock and Poultry: Dose, Toxicokinetics, Toxicity and Estrogenicity. *Toxins*, 12(6). pp. 377-406. <https://doi.org/10.3390/toxins12060377>
- Liu, KH; Sun, XF; Feng, YZ; Cheng, SF; Li, B; Li, YP; Shen, W y Li, L. (2017). The impact of Zearalenone on the meiotic progression and primordial follicle assembly during early

- oogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 9-17.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.05.024>
- Liu, T; Zhu, W; Yang, X; Chen, L; Yang, R; Hua, Z y Li, G. (2009). Detection of apoptosis based on the interaction between annexin V and phosphatidylserine. *Analytical Chemistry*, 81(6), 2410-2413. <https://doi.org/10.1021/ac801267s>
- Liu, XL; Wu, RY; Sun, XF; Cheng, SF; Zhang, RQ; Zhang, TY; Zhang, XF; Zhao, Y; Shen, W y Li, L. (2018). Mycotoxin zearalenone exposure impairs genomic stability of swine follicular granulosa cells in vitro. *International Journal of Biological Sciences*, 14(3), 294-305. <https://doi.org/10.7150/ijbs.23898>
- Liu, Y y Nair, MG. (2010). An efficient and economical MTT assay for determining the antioxidant activity of plant natural product extracts and pure compounds. *Journal of Natural Products*, 73(7), 1193-1195. <https://doi.org/10.1021/np1000945>
- Locksley, RM; Killeen, N y Lenardo, MJ. (2001). The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian Biology. *Cell*, 104(4), 487-501. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00237-9)
- Lozano-Sánchez, J; Borrás-Linares, I; Sass-Kiss, A y Segura-Carretero, A. (2018). Chapter 13 - Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). En D.-W. Sun (Ed.), *Modern Techniques for Food Authentication (Second Edition)* (pp. 459-526). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814264-6.00013-X>
- Lu, S. C y Huang, HY. (1994). Comparison of sulfur amino acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 47(5), 859-869. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(94\)90486-3](https://doi.org/10.1016/0006-2952(94)90486-3)

- Macey, MG. (2007). Principles of Flow Cytometry. En M. G. Macey (Ed.), *Flow Cytometry: Principles and Applications* (pp. 1-15). Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-451-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-451-3_1)
- Magan, N; Hope, R; Cairns, V y Aldred, D. (2003). Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. En X. Xu, J. A. Bailey, y B. M. Cooke (Eds.), *Epidemiology of Mycotoxin Producing Fungi: Under the aegis of COST Action 835 'Agriculturally Important Toxigenic Fungi 1998–2003', EU project (QLK 1-CT-1998–01380)*, pp. 723-730. Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-017-1452-5_7)
- Majno, G y Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology*, 146(1), 3-15. doi <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1870771/>
- Majtnerová, P y Roušar, T. (2018). An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, 45(5), 1469-1478. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4258-9>
- Makowska, K; Obremski, K; Zielonka, L y Gonkowski, S. (2017). The Influence of Low Doses of Zearalenone and T-2 Toxin on Calcitonin Gene Related Peptide-Like Immunoreactive (CGRP-LI) Neurons in the ENS of the Porcine Descending Colon. *Toxins*, 9(3), E98. <https://doi.org/10.3390/toxins9030098>
- Makun, HA; Gbodi, TA; Akanya, OH; Salako, EA y Ogbadu, GH. (2007). Fungi and some mycotoxins contaminating rice (*Oryza Sativa*) in Niger State, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6(2), pp. 099-108, Article 2. <https://doi.org/10.4314/ajb.v6i2.56106>

- Mally, A; Solfrizzo, M y Degen, GH. (2016). Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: Current state-of-the art and application to human exposure assessment. *Archives of Toxicology*, 90(6). pp.1281-1292. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1704-0>
- Manizan, AL; Oplatowska-Stachowiak, M; Piro-Metayer, I; Campbell, K; Koffi-Nevry, R; Elliott, C; Akaki, D; Montet, D y Brabet, C. (2018). Multi-mycotoxin determination in rice, maize and peanut products most consumed in Côte d'Ivoire by UHPLC-MS/MS. *Food Control*, 87, pp. 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.032>
- Marasas, WFO; Nelson, PE y Toussoun, TA. (1984). Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology. *Toxigenic Fusarium Species. Identity and Mycotoxicology*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19871323192>
- Marín, S; Ramos, AJ; Cano-Sancho, G y Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 60. pp. 218-237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Marín, S; Sanchis, V; Sáenz, R; Ramos, AJ; Vinas, I y Magan, N. (1998). Ecological determinants for germination and growth of some Aspergillus and Penicillium spp. From maize grain. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 25-36. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1997.00297.x>
- Marnett, LJ. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21(3), 361-370. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.361>
- Marti, GE; Stetler-Stevenson, M; Bleesing, JJ y Fleisher, TA. (2001). Introduction to flow cytometry. *Seminars in Hematology*, 38(2), 93-99. [https://doi.org/10.1016/s0037-1963\(01\)90043-5](https://doi.org/10.1016/s0037-1963(01)90043-5)

- Martinvalet, D; Zhu, P y Lieberman, J. (2005). Granzyme A Induces Caspase-Independent Mitochondrial Damage, a Required First Step for Apoptosis. *Immunity*, 22(3), 355-370. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.02.004>
- Martucciello, S; Masullo, M; Cerulli, A y Piacente, S. (2020). Natural Products Targeting ER Stress, and the Functional Link to Mitochondria. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1905. <https://doi.org/10.3390/ijms21061905>
- Masson, JJR; Ostrowski, M; Duette, G; Lee, MKS; Murphy, AJ; Crowe, SM y Palmer, CS. (2020). The Multiparametric Analysis of Mitochondrial Dynamics in T Cells from Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs). *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2184, 215-224. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0802-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0802-9_15)
- Mayr, U; Butsch, A y Schneider, S. (1992). Validation of two in vitro test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts. *Toxicology*, 74(2), 135-149. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(92\)90134-Z](https://doi.org/10.1016/0300-483X(92)90134-Z)
- McConkey, DJ y Orrenius, S. (1997). The Role of Calcium in the Regulation of Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 239(2), 357-366. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7409>
- McDonnell, DP; Connor, CE; Wijayaratne, A; Chang, CY y Norris, JD. (2002). Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent Progress in Hormone Research*, 57, 295-316. <https://doi.org/10.1210/rp.57.1.295>
- Mesnil, M; Crespin, S; Avanzo, JL y Zaidan-Dagli, ML. (2005). Defective gap junctional intercellular communication in the carcinogenic process. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1719(1-2), 125-145. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.004>

- Milani, J. (2013). Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. *Veterinárni Medicína*, 58(8), pp. 405-411. <https://doi.org/10.17221/6979-VETMED>
- Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS). (2013). Resolución Número 2674 de 2013.
- Milićević, DR; Skrinjar, M y Baltić, T. (2010). Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: Challenges for food safety control. *Toxins*, 2(4), 572-592. <https://doi.org/10.3390/toxins2040572>
- Moretti, A; Logrieco, AF y Susca, A. (2017). Mycotoxins: An Underhand Food Problem. En A. Moretti y A. Susca (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols* (pp. 3-12). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_1)
- Morris, Navarro LF (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*. (Trabajo de grado Maestría). Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/8318>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Moss, MO. (1996). Mycotoxins. *Mycological Research*, 100(5), 513-523. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80001-3](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80001-3)
- Mullen, P. (2004). PARP cleavage as a means of assessing apoptosis. *Methods in Molecular Medicine*, 88, 171-181. <https://doi.org/10.1385/1-59259-406-9:171>
- Nacalai, Tesque Inc. (S. F.). Nacalai Tesque, Inc. Recuperado 20 de marzo de 2022, de <https://www.nacalai.co.jp/>

- Naeem, A; James, N; Tanvir, M; Marriam, M; Nathaniel, S y Nathaniel, S. (2017). Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS): An Advanced Cell Sorting Technique. *PSM Biological Research*, 2(2), 83-88.
- Neme, K y Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. *Food Control*, 78, 412-425. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.012>
- Niles, AL; Moravec, RA y Riss, TL. (2008). Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(6), 655-669. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.6.655>
- Norbury, CJ; y Hickson, ID. (2001). Cellular Responses to DNA Damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41(1), 367-401. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.367>
- Norbury, CJ y Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, 23(16), 2797-2808. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207532>
- Nutrition Division. (2003). *Manual sobre la aplicación del sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (APPCC) en la prevención y control de las micotoxinas: Centro da Capacitación y Referencia FAO/OIEA para el Control de los Alimentos y los Plaguicidas*. FAO. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/7bbcbf7b-2fd4-59c0-8ff8-698d4bcf9c29/>
- Obeng, E. (2020). Apoptosis (programmed cell death) and its signals—A review. *Brazilian Journal of Biology*, 81, 1133-1143. do: 10.1590/1519-6984.228437

- O'Brien, MA; Moravec, RA y Riss, TL. (2001). Poly (ADP-ribose) polymerase cleavage monitored in situ in apoptotic cells. *BioTechniques*, 30(4), 886-891. <https://doi.org/10.2144/01304pf01>
- Ok, HE; Kim, DM; Kim, D; Chung, SH; Chung, MS; Park, KH y Chun, HS. (2014). Mycobiota and natural occurrence of aflatoxin, deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in rice freshly harvested in South Korea. *Food Control*, 37, 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.09.020>
- Omotayo, O. P., Omotayo, A. O., Mwanza, M., y Babalola, O. O. (2019). Prevalence of Mycotoxins and Their Consequences on Human Health. *Toxicological Research*, 35(1), 1-7. <https://doi.org/10.5487/TR.2019.35.1.001>
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: Life, death and cancer. *Cell Death & Differentiation*, 10(4), 431-442. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401183>
- Orrenius, S; Zhivotovsky, B y Nicotera, P. (2003). Regulation of cell death: The calcium–apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(7), 552-565. <https://doi.org/10.1038/nrm1150>
- Osuchowski, MF y Sharma, RP. (2005). Fumonisin B1 Induces Necrotic Cell Death in BV-2 Cells and Murine Cultured Astrocytes and is Antiproliferative in BV-2 Cells While N2A Cells and Primary Cortical Neurons are Resistant. *NeuroToxicology*, 26(6), 981-992. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2005.05.001>
- Ouanes, Z; Abid, S; Ayed, I; Anane, R; Mobio, T; Creppy, EE y Bacha, H. (2003). Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: Protective effect of Vitamin E. *Mutation Research*, 538(1-2). pp.63-70. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(03\)00093-7](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(03)00093-7)

- Ouanes-Ben Othmen, Z; Essefi, S y Bacha, H. (2008). Mutagenic and epigenetic mechanisms of zearalenone: Prevention by Vitamin E. *World Mycotoxin Journal*, 1(3), 369-374. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1036>
- Palacios, Prú EL y Mendoza Briceño, RV. (1972). An unusual relationship between glial cells and neuronal dendrites in olfactory bulbs of *Desmodus rotundus*. *Brain Research*, 36(2), 404-408. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(72\)90744-5](https://doi.org/10.1016/0006-8993(72)90744-5)
- Park, AR; Son, H; Min, K; Park, J; Goo, JH; Rhee, S; Chae, SK y Lee, YW. (2015). Autoregulation of ZEB2 expression for zearalenone production in *Fusarium graminearum*. *Molecular Microbiology*, 97(5), 942-956. <https://doi.org/10.1111/mmi.13078>
- Park, JW; Choi, SY; Hwang, HJ y Kim, YB. (2005). Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*, 103(3), 305-314. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.02.001>
- Paterson, RRM y Lima, N. (2010). How will climate change affect mycotoxins in food? *Food Research International*, 43(7), pp. 1902-1914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.07.010>
- Patil, C y Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: The unfolded protein response in yeast and mammals. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(3), 349-355. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00219-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00219-2)
- Patriarca, A y Fernández, Pinto V. (2017). Prevalence of mycotoxins in foods and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.011>
- Peng, X; Yu, Z; Liang, N; Chi, X; Li, X; Jiang, M; Fang, J; Cui, H; Lai, W; Zhou, Y y Zhou, S. (2016). The mitochondrial and death receptor pathways involved in the thymocytes

- apoptosis induced by aflatoxin B1. *Oncotarget*, 7(11), 12222-12234.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7731>
- Pereira, CMF. (2013). Crosstalk between Endoplasmic Reticulum Stress and Protein Misfolding in Neurodegenerative Diseases. *ISRN Cell Biology*, 2013, e256404.  
<https://doi.org/10.1155/2013/256404>
- Perkowski, J; Plattner, R; Goliński, P; Vesonder, R y Chelkowski, J. (1990). Natural occurrence of deoxynivalenol, 3-acetyl-deoxynivalenol, 15-acetyl-deoxynivalenol, nivalenol, 4,7-dideoxynivalenol, and zearalenone in polish wheat. *Mycotoxin Research*, 6(1), 7-12.  
<https://doi.org/10.1007/BF03192133>
- Petit, PX; Lecoer, H; Zorn, E; Dauguet, C; Mignotte, B y Gougeon, ML. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 130(1), 157-167.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.130.1.157>
- Pfeiffer, E; Kommer, A; Dempe, JS; Hildebrand, AA y Metzler, M. (2011). Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells in vitro. *Molecular Nutrition & Food Research*, 55(4), 560-567.  
<https://doi.org/10.1002/mnfr.201000381>
- Pistol, GC; Gras, MA; Marin, DE; Israel-Roming, F; Stancu, M y Taranu, I. (2014). Natural feed contaminant zearalenone decreases the expressions of important pro- and anti-inflammatory mediators and mitogen-activated protein kinase/NF-κB signalling molecules in pigs. *The British Journal of Nutrition*, 111(3), 452-464.  
<https://doi.org/10.1017/S0007114513002675>

- Pistritto, G; Trisciuglio, D; Ceci, C; Garufi, A y D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- Plenchette, S; Filomenko, R; Logette, E; Solier, S; Buron, N; Cathelin, S y Solary, E. (2004). Analyzing markers of apoptosis in vitro. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 281, 313-331. <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:313>
- Poon, IKH; Lucas, CD; Rossi, AG y Ravichandran, KS. (2014). Apoptotic cell clearance: Basic biology and therapeutic potential. *Nature Reviews Immunology*, 14(3), 166-180. <https://doi.org/10.1038/nri3607>
- Pozarowski, P; Grabarek, J y Darzynkiewicz, Z. (2003). Flow Cytometry of Apoptosis. *Current Protocols in Cell Biology*, 21(1). <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb1808s21>
- Rai, A; Dixit, S; Singh, SP; Gautam, NK; Das, M y Tripathi, A. (2018). Presence of Zearalenone in Cereal Grains and Its Exposure Risk Assessment in Indian Population. *Journal of Food Science*, 83(12), 3126-3133. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14404>
- Rai, A; Das, M y Tripathi, A. (2020). Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2710-2729. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
- Rai, NK; Tripathi, K; Sharma, D y Shukla, VK. (2005). Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 4(3), 138-144. <https://doi.org/10.1177/1534734605280018>
- Rajendran, P; Ammar, RB; Al-Saeedi, FJ; Mohamed, ME; ElNaggar, MA; Al-Ramadan, SY; Bekhet, GM y Soliman, AM. (2021). Kaempferol Inhibits Zearalenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis via the PI3K/Akt-Mediated Nrf2 Signaling Pathway: In Vitro and In

- Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 217.  
<https://doi.org/10.3390/ijms22010217>
- Ramaswamy, M; Deng, M y Siegel, RM. (2011). Harnessing programmed cell death as a therapeutic strategy in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 7(3), 152-160.  
<https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.225>
- Rami, A. (2003). Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: The calpain–calpastatin–caspase hypothesis. *Neurobiology of Disease*, 13(2), 75-88. [https://doi.org/10.1016/S0969-9961\(03\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S0969-9961(03)00018-4)
- Rawlings, ND; Barrett, AJ y Bateman, A. (2010). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl\_1), D227-D233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp971>
- Reynolds, ES. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *The Journal of Cell Biology*, 17, 208-212.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Richetti, A; Cavallaro, A; Ainis, T y Fimiani, V. (2003). Effect of some mycotoxins on superoxide anion production of isolated human neutrophils and in whole blood. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 25(3), 441-449. <https://doi.org/10.1081/iph-120024511>
- Riss, TL; Moravec, RA; Niles, AL; Duellman, S; Benink, HA; Worzella, TJ y Minor, L. (2016). Cell Viability Assays. En *Assay Guidance Manual [Internet]*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Rizzuto, R; Pinton, P; Carrington, W; Fay, FS; Fogarty, KE; Lifshitz, LM; Tuft, RA y Pozzan, T. (1998). Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial

Ca<sup>2+</sup> Responses. *Science*, 280(5370), 1763-1766.  
<https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>

Rodríguez-Carrasco, Y; Moltó, JC; Berrada, H y Mañes, J. (2014). A survey of trichothecenes, zearalenone and patulin in milled grain-based products using GC-MS/MS. *Food Chemistry*, 146, 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.053>

Rogowska, A; Pomastowski, P; Sagandykova, G y Buszewski, B. (2019). Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicon*, 162, pp.46-56. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.004>

Rojas, Contreras L. (2021). Estudio de la incidencia de aflatoxinas, zearalenona y desoxinivalenol en el arroz producido en las principales zonas arroceras de Colombia [Ph.D. Thesis, Universitat Autònoma de Barcelona]. En *TDX (Tesis Doctorals en Xarxa)*. <http://www.tdx.cat/handle/10803/671611>

Rojas, MD; Peterson, DL; Barboza, L; Terán-Ángel, G; Labastida-Moreno, CA; Berrueta, L y Salmen, S. (2014). Programmed hepatocytes cell death associated with FLIP downregulation in response to extracellular preS1/2. *Journal of Medical Virology*, 86(3), 496-504. <https://doi.org/10.1002/jmv.23859>

Ropejko, K y Twarużek, M. (2021). Zearalenone and Its Metabolites—General Overview, Occurrence, and Toxicity. *Toxins*, 13(1), 35. <https://doi.org/10.3390/toxins13010035>

Saelens, X; Festjens, N; Walle, LV; Gorp, M; Van, Loo G; Van, y Vandenaabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23(16), 2861-2874. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207523>

- Sakamuru, S; Attene-Ramos, MS y Xia, M. (2016). Mitochondrial Membrane Potential Assay. En H. Zhu y M. Xia (Eds.), *High-Throughput Screening Assays in Toxicology* (Vol. 1473, pp. 17-22). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6346-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6346-1_2)
- Sakamuru, S; Li, X; Attene-Ramos, MS; Huang, R; Lu, J; Shou, L; Shen, M; Tice, RR; Austin, CP y Xia, M. (2012). Application of a homogenous membrane potential assay to assess mitochondrial function. *Physiological Genomics*, 44(9), 495-503. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00161.2011>
- Sang, Y; Li, W y Zhang, G. (2016). The protective effect of resveratrol against cytotoxicity induced by mycotoxin, zearalenone. *Food & Function*, 7(9), 3703-3715. <https://doi.org/10.1039/C6FO00191B>
- Saraste, A y Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research*, 45(3), 528-537. [https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(99\)00384-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(99)00384-3)
- Savi, GD; Piacentini, KC; Rocha, LO; Carnielli-Queiroz, L; Furtado, BG; Scussel, R; Zanoni, ET; Machado-De-Ávila, RA; Corrêa, B y Angioletto, E. (2018). Incidence of toxigenic fungi and zearalenone in rice grains from Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 270, 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.02.004>
- Schimmer, AD. (2004). Inhibitor of apoptosis proteins: Translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Research*, 64(20), 7183-7190. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1918>
- Schmit, T; Klomp, M y Khan, MN. (2021). An Overview of Flow Cytometry: Its Principles and Applications in Allergic Disease Research. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2223, 169-182. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1001-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1001-5_13)

- Schuler, M y Green, DR. (2001). Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochemical Society Transactions*, 29(6), 684-688. <https://doi.org/10.1042/bst0290684>
- Sciau, Ph. (2016). Chapter Two - Transmission Electron Microscopy: Emerging Investigations for Cultural Heritage Materials. En P. W. Hawkes (Ed.), *Advances in Imaging and Electron Physics* (Vol. 198, pp. 43-67). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aiep.2016.09.002>
- Sherma, J y Fried, B. (2005). Thin Layer Chromatographic Analysis of Biological Samples. A Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28(15), 2297-2314. <https://doi.org/10.1080/10826070500187491>
- Shi, B, Su, Y; Chang, S; Sun, Y; Meng, X y Shan, A. (2017). Vitamin C protects piglet liver against zearalenone-induced oxidative stress by modulating expression of nuclear receptors PXR and CAR and their target genes. *Food & Function*, 8(10), pp. 3675-3687. <https://doi.org/10.1039/C7FO01301A>
- Shier, WT; Shier, AC; Xie, W y Mirocha, CJ. (2001). Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39(9), 1435-1438. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(00\)00259-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(00)00259-2)
- Singh, N y Bose, K. (2015). Apoptosis: Pathways, Molecules and Beyond. En K. Bose (Ed.), *Proteases in Apoptosis: Pathways, Protocols and Translational Advances* (pp. 1-30). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-19497-4_1)
- Singh, BK; Tiwari, S y Dubey, NK. (2021). Essential oils and their nanoformulations as green preservatives to boost food safety against mycotoxin contamination of food commodities: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(12), 4879-4890. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11255>

- Sivandzade, F; Bhalerao, A y Cucullo, L. (2019). Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe. *BIO-PROTOCOL*, 9(1). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3128>
- Smith, MC; Madec, S; Coton, E y Hymery, N. (2016). Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*, 8(4), 1-36. <https://doi.org/10.3390/toxins8040094>
- Smyth, PG y Berman, SA. (2002). Markers of apoptosis: Methods for elucidating the mechanism of apoptotic cell death from the nervous system. *BioTechniques*, 32(3), 648-650, 652, 654 passim. <https://doi.org/10.2144/02323dd02>
- So, MY; Tian, Z; Phoon, YS; Sha, S; Antoniou, MN; Zhang, J; Wu, RSS y Tan-Un, KC. (2014). Gene Expression Profile and Toxic Effects in Human Bronchial Epithelial Cells Exposed to Zearalenone. *PLOS ONE*, 9(5), e96404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096404>
- Souza, WCO; Nascimento, LC; Oliveira, MDM; Porcino, MM y Silva, HAO. (2018). Genetic diversity of *Fusarium* spp. In pineapple 'Pérola' cultivar. *European Journal of Plant Pathology*, 150(4), 853-868. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1328-0>
- Springler, A; Hessenberger, S; Reisinger, N; Kern, C; Nagl, V; Schatzmayr, G y Mayer, E. (2017). Deoxynivalenol and its metabolite deepoxy-deoxynivalenol: Multi-parameter analysis for the evaluation of cytotoxicity and cellular effects. *Mycotoxin Research*, 33(1), 25-37. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0260-z>
- Stakheev, A. A., Erokhin, D. V., Meleshchuk, E. A., Mikityuk, O. D., y Statsyuk, N. V. (2022). Effect of Compactin on the Mycotoxin Production and Expression of Related Biosynthetic

- and Regulatory Genes in Toxigenic *Fusarium culmorum*. *Microorganisms*, *10*(7), 1347. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10071347>
- Stępień, Ł; Koczyk, G y Waśkiewicz, A. (2013). Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. *Journal of Applied Genetics*, *54*(3), 367-380. <https://doi.org/10.1007/s13353-013-0146-0>
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nature Reviews Immunology*, *5*(3), 189-200. <https://doi.org/10.1038/nri1568>
- Summerell, BA; Salleh, B y Leslie, JF. (2003). A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease*, *87*(2), 117-128. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.2.117>
- Sun, L; Dai, J; Xu, J; Yang, J y Zhang, D. (2022). Comparative Cytotoxic Effects and Possible Mechanisms of Deoxynivalenol, Zearalenone and T-2 Toxin Exposure to Porcine Leydig Cells In Vitro. *Toxins*, *14*(2), 113. <https://doi.org/10.3390/toxins14020113>
- Tamura, M; Mochizuki, N; Nagatomi, Y; Harayama, K; Toriba, A y Hayakawa, K. (2015). A method for simultaneous determination of 20 *Fusarium* toxins in cereals by high-resolution liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry with a pentafluorophenyl column. *Toxins*, *7*(5), 1664-1682. <https://doi.org/10.3390/toxins7051664>
- Tatay, E; Espín, S; García-Fernández, AJ y Ruiz, MJ. (2017). Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells. *Toxicology in Vitro*, *45*, 334-339. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.026>
- Tatay, E; Font, G y Ruiz, MJ. (2016). Cytotoxic effects of zearalenone and its metabolites and antioxidant cell defense in CHO-K1 cells. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *96*, 43-49. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.027>

- Tatay, E; Meca, G; Font, G y Ruiz, MJ. (2014). Cytotoxic and interactive effects of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol and formation of metabolites in HepG2 cells. *Rev. Toxicol*, 187-195.
- Tobey, RA. (1975). Different drugs arrest cells at a number of distinct stages in G2. *Nature*, 254(5497), 245-247. <https://doi.org/10.1038/254245a0>
- Britannica. (s. f.). Transmission electron microscope | instrument | Britannica. Recuperado 10 de julio de 2022, de <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>
- Travers, KJ; Patil, CK; Wodicka, L; Lockhart, DJ; Weissman, JS y Walter, P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*, 101(3), 249-258. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80835-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80835-1)
- Tuchin, VV; Tárnok, A y Zharov, VP. (2011). In vivo flow cytometry: A horizon of opportunities. *Cytometry Part A*, 79A(10), 737-745. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21143>
- Urry, WH; Wehrmeister, HL; Hodge, EB y Hidy, PH. (1966). The structure of zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 7(27), 3109-3114. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(01\)99923-X](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(01)99923-X)
- Van, Loo G; Van, Gorp M; Depuydt, B; Srinivasula, SM; Rodriguez, I; Alnemri, ES; Gevaert, K; Vandekerckhove, J; Declercq, W y Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from, mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death and Differentiation*, 9(1), 20-26. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400970>
- Verhulst, C; Coiffard, C; Coiffard, LJM; Rivalland, P y De Roeck-Holtzhauer, Y. (1998). In vitro correlation between two colorimetric assays and the pyruvic acid consumption by

- fibroblasts cultured to determine the sodium laurylsulfate cytotoxicity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 39(3), 143-146.  
[https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(98\)00016-1](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(98)00016-1)
- Viera, Limon MJ; Morlett, Chavez JA; Sierra, Rivera CA; Contreras, DL y Zugasti-Cruz, A. (2015). Zearalenone Induced Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Peripheral Blood Leukocytes. *Toxicology: Open Access*, 01(01). <https://doi.org/10.4172/2476-2067.1000102>
- Virk, P; Al-mukhaizeem, NAR; Bin, Morebah SH; Fouad, D y Elobeid, M. (2020). Protective effect of resveratrol against toxicity induced by the mycotoxin, zearalenone in a rat model. *Food and Chemical Toxicology*, 146, 111840. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111840>
- Vlata, Z; Porichis, F; Tzanakakis, G; Tsatsakis, A y Krambovitis, E. (2006). A study of zearalenone cytotoxicity on human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology Letters*, 165(3). pp. 274-281. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.05.001>
- Vousden, KH y Lane, DP. (2007). P53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(4), 275-283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>
- Wajant, H. (2002). The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science*, 296(5573), 1635-1636. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>
- Wang<sup>a</sup>, DB; Kinoshita, C; Kinoshita, Y y Morrison, RS. (2014). P53 and mitochondrial function in neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1842(8), 1186-1197. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.015>
- Wang<sup>b</sup>, S y El-Deiry, WS. (2004). Cytochrome c: A crosslink between the mitochondria and the endoplasmic reticulum in calcium-dependent apoptosis. *Cancer Biology & Therapy*, 3(1), 44-46. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.1.740>

- Wang<sup>c</sup>, Y; Zheng, W; Bian, X; Yuan, Y; Gu, J; Liu, X; Liu, Z y Bian, J. (2014). Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in primary Leydig cells. *Toxicology Letters*, 226(2), 182-191. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.003>
- Wang, X; Yu, H; Fang, H; Zhao, Y; Jin, Y; Shen, J; Zhou, C; Zhou, Y; Fu, Y; Wang, J y Zhang, J. (2019). Transcriptional profiling of zearalenone-induced inhibition of IPEC-J2 cell proliferation. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 172, 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.10.004>
- Watson, ML. (1958). Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4(4), 475-478. <https://doi.org/10.1083/jcb.4.4.475>
- Wentzel, JF, Lombard, MJ; Du Plessis, LH y Zandberg, L. (2017). 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*, 91(5), 2265-2282. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1872-y>
- Wilkerson, MJ. (2012). Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 42(1), 53-71. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.012>
- Winey, M; Meehl, JB; O'Toole, ET y Giddings, TH. (2014). Conventional transmission electron microscopy. *Molecular Biology of the Cell*, 25(3), 319-323. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0863>
- Xu, C; Bailly-Maitre, B y Reed, JC. (2005). Endoplasmic reticulum stress: Cell life and death decisions. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2656-2664. <https://doi.org/10.1172/JCI26373>

- Xu, ML; Hu, J; Guo, BP; Niu, YR; Xiao, C y Xu, YX. (2016). Exploration of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in zearalenone-treated rat sertoli cells. *Environmental Toxicology*, 31(12), 1731-1739. <https://doi.org/10.1002/tox.22175>
- Yamashima, T. (2004). Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: A conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium*, 36(3), 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.03.001>
- Yang, JY; Wang, GX; Liu, JL; Fan, JJ y Cui, S. (2007). Toxic effects of zearalenone and its derivatives  $\alpha$ -zearalenol on male reproductive system in mice. *Reproductive Toxicology*, 24(3), 381-387. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.05.009>
- Yang, LJ; Zhou, M; Huang, LB; Yang, WR; Yang, ZB; Jiang, SZ y Ge, JS. (2018). Zearalenone-Promoted Follicle Growth through Modulation of Wnt-1/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway and Expression of Estrogen Receptor Genes in Ovaries of Postweaning Piglets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(30), 7899-7906. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02101>
- Yazar, S y Omurtag, GZ. (2008). Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(11), pp. 2062-2090. <https://doi.org/10.3390/ijms9112062>
- Yin, S; Liu, X; Fan, L y Hu, H. (2018). Mechanisms of cell death induction by food-borne mycotoxins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(8), 1406-1417. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1260526>
- Yu, JY; Zheng, ZH; Son, YO; Shi, X; Jang, YO y Lee, JC. (2011). Mycotoxin zearalenone induces AIF- and ROS-mediated cell death through p53- and MAPK-dependent signaling pathways

- in RAW264.7 macrophages. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 1654-1663.  
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.07.002>
- Yu, M; Chen, L; Peng, Z; Wang, D; Song, Y; Wang, H; Yao, P; Yan, H; Nüssler, AK; Liu, L; y Yang, W. (2017). Embryotoxicity Caused by DON-Induced Oxidative Stress Mediated by Nrf2/HO-1 Pathway. *Toxins*, 9(6), 188. <https://doi.org/10.3390/toxins9060188>
- Yu, Z; Zhang, L; Wu, D y Liu, F. (2005). Anti-apoptotic action of zearalenone in MCF-7 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(3), 441-446.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.003>
- Yue, J y López, JM. (2020). Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2346.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21072346>
- Zaied, C; Zouaoui, N; Bacha, H y Abid, S. (2012). Natural occurrence of zearalenone in Tunisian wheat grains. *Food Control*, 25(2), 773-777.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.012>
- Zain, ME. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(2), 129-144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- Zamzami, N; Métivier, D y Kroemer, G. (2000). Quantitation of Mitochondrial Transmembrane Potential in Cells and in Isolated Mitochondria. *Methods in Enzymology*, 322, 208-213.  
[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)22021-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)22021-1)
- Zhang<sup>a</sup>, GL; Feng, YL; Song, JL y Zhou, XS. (2018). Zearalenone: A Mycotoxin With Different Toxic Effect in Domestic and Laboratory Animals' Granulosa Cells. *Frontiers in Genetics*, 9, 667. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00667>

- Zhang, GL; Sun, XF; Feng, YZ; Li, B; Li, YP; Yang, F; Nyachoti, CM; Shen, W; Sun, SD y Li, L. (2017). Zearalenone exposure impairs ovarian primordial follicle formation via down-regulation of Lhx8 expression in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 317, 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.01.004>
- Zhang<sup>b</sup>, K; Tan, X; Li, Y; Liang, G; Ning, Z; Ma, Y y Li, Y. (2018). Transcriptional profiling analysis of Zearalenone-induced inhibition proliferation on mouse thymic epithelial cell line 1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 153, 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.01.005>
- Zheng, W; Pan, S; Wang, G; Wang, YJ; Liu, Q; Gu, J; Yuan, Y; Liu, XZ; Liu, ZP y Bian, JC. (2016). Zearalenone impairs the male reproductive system functions via inducing structural and functional alterations of sertoli cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42, 146-155. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.01.013>
- Zheng<sup>a</sup>, W; Wang, B; Li, X; Wang, T; Zou, H; Gu, J; Yuan, Y; Liu, X; Bai, J; Bian, J y Liu, Z. (2018). Zearalenone Promotes Cell Proliferation or Causes Cell Death? *Toxins*, 10(5), 184. <https://doi.org/10.3390/toxins10050184>
- Zheng<sup>b</sup>, WL; Wang, BJ; Wang, L; Shan, YP; Zou, H; Song, RL; Wang, T; Gu, JH; Yuan, Y; Liu, XZ; Zhu, GQ; Bai, JF; Liu, ZP y Bian, JC. (2018). ROS-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Zearalenone in Mouse Sertoli Cells via ER Stress and the ATP/AMPK Pathway. *Toxins*, 10(1), 24. <https://doi.org/10.3390/toxins10010024>
- Zhou, C; Zhang, Y; Yin, S; Jia, Z y Shan, A. (2015). Biochemical changes and oxidative stress induced by zearalenone in the liver of pregnant rats. *Human & Experimental Toxicology*, 34(1). pp.65-73. <https://doi.org/10.1177/0960327113504972>

- Ziegler, U y Groscurth, P. (2004). Morphological Features of Cell Death. *Physiology*, 19(3), 124-128. <https://doi.org/10.1152/nips.01519.2004>
- Zinedine, A; Soriano, JM; Moltó, JC y Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2006.07.030>
- Zong, WX y Thompson, CB. (2006). Necrotic death as a cell fate. *Genes & Development*, 20(1), 1-15. <https://doi.org/10.1101/gad.1376506>
- Zuo, JM y Spence, JCH. (2017). Introduction and Historical Background. En J. M. Zuo y J. C. H. Spence (Eds.), *Advanced Transmission Electron Microscopy: Imaging and Diffraction in Nanoscience* (pp. 1-18). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6607-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6607-3_1)