

198

Rej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFECTO DE LAS MICOTOXINAS DE LOS
HONGOS *Fusarium* spp. y *Aspergillus* spp.
EN CULTIVO DE TEJIDOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
REYNA RUBI SOLIS RUBIO

MEXICO, D. F.

1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE.

	Páginas.
Dedicatorias	i
Agradecimientos	vi
ÍNDICE	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tablas	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
INTRODUCCIÓN	1
ZEARALENONA	
a) Definición	4
b) Antecedentes históricos	4
c) Metabolismo	6
AFLATOXINAS	
a) Definición	8
b) Antecedentes históricos	9
c) Metabolismo	13
TRICOTECENOS	
a) Definición	17
b) Antecedentes históricos	18
c) Metabolismo	21
CULTIVO DE TEJIDOS	25
MATERIAL Y METODOS	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	64
LITERATURA CITADA	66
Apéndice 1	78
Apéndice 2	83
Apéndice 3	85

LISTA DE FIGURAS.

	Páginas.
1. Productos químicos derivados de la Zearalenona .	5
2. Estructura química de las Aflatoxinas .	14
3. Diacetilación microsomal de Tricotecenos .	23
4. Diagrama del hemocitómetro de Neubauer .	37
5. Esquema del método para cultivo celular .	42
6. Efecto de la Zearalenona en células HeLa .	46
7. Efecto de Aflatoxinas y Tricotecenos en células HeLa .	49
8. Efecto del Deoxinivalenol (DON) y Diacetoxiscirpenol (DAS) en células HeLa .	51
9. Efecto de la Zearalenona en células EGM .	54
10. Efecto de Aflatoxinas y Tricotecenos en células EGM .	57
11. Efecto del Deoxinivalenol (DON) y Diacetoxiscirpenol (DAS) en células EGM .	59

I I S T A D E T A B L I A S .

	Páginas
1. Efecto de Zearalenona en Células HeLa. Primera placa celular.	45
2. Efecto de Aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 , G_2 y de Tricotecenos DON y DAS en Células HeLa. Segunda placa celular.	48
3. Efecto de Tricotecenos DON y DAS en Células HeLa. Tercera placa celular.	50
4. Efecto de Zearalenona en Células BGM. Primera placa celular.	53
5. Efecto de Aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 , G_2 y de tricotecenos DON y DAS en Células BGM. Segunda placa celular	56
6. Efecto de Tricotecenos DON y DAS en Células BGM. Tercera placa celular.	58

RESUMEN.

Se estudió el efecto de diferentes micotoxinas, Zearalenona, Aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 , Deoxinivalenol (DON) y Diacetoxiscirpenol (DAS) sobre el cultivo celular de cáncer cervicouterino humano, procedente de una persona llamada Helen Lane, de ahí su nombre HeLa, y se comparó su efecto sobre el cultivo celular procedente de riñón de mono verde, BGK (Buffalo Green Monkey).

Se aplicaron diferentes concentraciones de micotoxinas en distintos volúmenes de dimetilsulfóxido al 1% (2.5ppb en 1.2 μ l, 5ppb en 2.5 μ l, 10ppb en 5 μ l, 50ppb en 25 μ l y 100ppb en 50 μ l para las aflatoxinas; 1.2ppm en 1.2 μ l, 2ppm en 2 μ l, 4ppm en 4 μ l, 6ppm en 6 μ l, 8ppm en 8 μ l, 10ppm en 10 μ l, 20ppm en 20 μ l, 35ppm en 35 μ l y 50ppm en 50 μ l para la zearalenona y los tricotecenos) en cultivos celulares "in vitro", esperando para conocer su efecto 24hrs. para la zearalenona, 18hrs. para las aflatoxinas y 16hrs. para los tricotecenos. La zearalenona, el deoxinivalenol y el diacetoxiscirpenol se aplicaron a concentraciones de ppm y las aflatoxinas a concentraciones de ppb, debido a su toxicidad, notándose una gradación en los efectos tóxicos en proporción directa a los volúmenes y al tiempo de exposición.

Se obtuvo la dosis letal (LD_{50}) al 50% de las células, observándose diferencias en la toxicidad de las micotoxinas. La dosis letal de la zearalenona fue de 6ppm (6 μ l), B_1 de 10ppb (5 l), G_2 de 50ppb (25 μ l) y deoxinivalenol de 8ppm (8 μ l), en células HeLa. La dosis letal en células BGK fue para la zearalenona de 4ppm (4 μ l) B_1 de 2.5ppb (1.2 μ l), B_2 , G_1 y G_2 de 10ppb (5 μ l) y deoxinivalenol de 6ppm (6 μ l). Para el diacetoxiscirpenol no fue posible obtener dosis letal. Estos resultados demostraron tener su confiabilidad de

las células HeLa a las distintas micotoxinas que las células BGM.

La zearalenona fue la que presentó menos efecto tóxico. De las aflatoxinas, la B₁ es la que causó mayor toxicidad en ambos cultivos celulares y de los tricotecenos, el diacetoxiscirpenol causó para todas las concentraciones de ambos cultivos celulares el 100% de toxicidad.

Las células BGM exhibieron mayor susceptibilidad a todas las micotoxinas, debido a que provienen de un órgano sano y las células HeLa exhibieron menor susceptibilidad a todas las micotoxinas porque son células provenientes de un cáncer, ya transformadas.

A B S T R A C T .

The effect of different mycotoxins, Zearalenone, Aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂, Deoxynivalenol (DON) and Diacetoxyscirpenol (DAS) on the cellular culture of human cervico-uterine cancer and healthy kidney monkey cells was studied. Helen Lane gave the name to HeLa cells where the study was done, and the results were compared to the effect of the same mycotoxins on cellular culture from Buffalo green monkey kidney (BGM).

Different concentrations of mycotoxins in different Dimethylsulphoxide (1%) volumes were applied (2.5ppb in 1.2 μ l; 5ppb in 2.5 μ l; 10ppb in 5 μ l; 50ppb in 25 μ l and 100ppb in 50 μ l for aflatoxins for zearalenone and trichothecenes the applied doses were 1.2ppm/1.2 μ l; 2ppm/2 μ l; 4ppm/4 μ l; 6ppm/6 μ l; 8ppm/8 μ l; 10ppm/10 μ l; 20ppm/20 μ l; 35ppm/35 μ l and 50ppm/50 μ l. These doses were applied in HeLa cell cultures "in vitro" and the effect was monitored after 24 hours for zearalenone, 18 hours for aflatoxins and 16 hours for trichothecenes.

The zearalenone, DON and DAS were applied in ppm and aflatoxins in ppb due to their different toxicity, a sequence in the effects was observed in direct proportion to the volumes and exposition time.

The lethal dose (LD₅₀) was obtained, presenting differences in the toxicity of the mycotoxins. The lethal dose in HeLa cells for zearalenone was 6ppm, for B₁ (10ppb), G₂ (50ppb) and DON (8ppm).

The lethal dose for BGM cells were for zearalenone (4ppm)

Aflatoxins B₁ (2.5ppb), B₂, G₁ and G₂ (10ppb), DON (6ppm). For DAS it was not possible to obtain the lethal dose because all the cells died with the smallest dose of 1.2ppm.

These results demonstrate less susceptibility of the HeLa cells to the different mycotoxins than the one presented in the PGH cells.

From the aflatoxins, the B₁ was the most toxic one in both cell cultures, and the trichothecenes, DAS caused 100% cellular death in both cellular cultures with all the doses.

The zearalenone was the less aggressive one.

The PGH cells exhibited more susceptibility to all the mycotoxins because they come from a healthy organ, and the HeLa cells exhibited less susceptibility to all mycotoxins because the cancer cells are already transformed.

INTRODUCCIÓN.

La creciente demanda de productos agrícolas en nuestro país ha impulsado fuertemente al sector agropecuario a incrementar sus niveles de productividad y eficiencia; queda aún bastante camino por recorrer a fin de satisfacer esta demanda en constante aumento, debido al crecimiento demográfico. Sin embargo, al entrar los productos agropecuarios a ser almacenados en forma masiva e industrializada debe tomarse en cuenta sus efectos en la salud pública.

En este aspecto la detección oportuna de agentes contaminantes en alimentos es una actividad de fundamental importancia, ya que ejercen efectos nocivos en la salud animal y humana. Se requieren estudios para determinar la magnitud del problema en México. Una de estas situaciones se refiere al problema de contaminación de alimentos por hongos y sus toxinas, empleados en explotaciones pecuarias o para consumo humano.

La proliferación de hongos en alimentos mal almacenados es un hecho bastante frecuente y es un problema de gran importancia.

Aunque una buena parte de los hongos contaminantes comunes en alimentos, no tiene efectos nocivos en la salud (Newberne, 1973), existen especies de mohos potencialmente peligrosos que pueden provocar desde una baja conversión del alimento, hasta una amplia gama de síndromes en animales (Shreeve *et al.*, 1975). Estos hongos patógenos pueden ejercer su efecto a través de la infección directa o bien por la acción de sus toxinas (Flood y Henderson, 1969).

Generalmente se encuentran varias especies de hongos contaminando en forma simultánea un alimento, y uno de los hallazgos más frecuentes constituye el aislamiento de hongos como Aspergillus spp. y Fusarium spp., productores de toxinas como son aflatoxinas, zearalenona, tricotecenos, etc. en los alimentos. Dichos hongos se desarrollan profundamente cuando las condiciones de humedad y temperatura les favorecen, especialmente en el caso de granos y forrajes con un mayor contenido de humedad, en los que se presenta como resultado el calentamiento y putrefacción, con crecimiento de hongos de diversos géneros,

Aunque estos hongos pueden llegar a provocar infecciones micóticas en los tejidos de los animales, sin duda revisten mayor importancia las toxicosis asociadas a su producción de toxinas.

Las micotoxinas afectan adversamente las respuestas inmunes a agentes infecciosas, tal es el caso de las aflatoxinas, patulina y esterigmatocistina. Muchas son termoestables y soportan operaciones como la peletización, la cocción y el enlatado o envasado, pudiendo así aparecer en la leche o en los productos animales constituyendo un problema para la salud humana (Shreeve et al., 1975).

Hay evidencias de que las toxinas de los hongos juegan un papel muy importante en la patogénesis de algunas enfermedades de los animales en varios países, tales como la "nefropatía porcina", en Dinamarca, "eczema facial del borrego", en Nueva Zelanda (Shreeve et al., 1975), el "síndrome estrogénico de orden alimenticio en cerdos", en México (Rosiles y López, 1977).

El número de hongos conocidos que pueden producir toxinas

es grande y las micotoxinas pueden afectar todos los sistemas del organismo.

Se dispone de poca información sobre la naturaleza o la extensión de estos problemas en nuestro país en humanos, por lo que el hombre, y el cultivo de tejidos humanos da la posibilidad de probar un modelo adecuado. Por tanto, un primer objetivo de la tesis es conocer los efectos de las diferentes micotoxinas a distintas concentraciones en las células HeLa de cáncer cervicouterino humano. Un segundo objetivo, es determinar la dosis letal media de estas micotoxinas para dichas células. El tercer objetivo es conocer el efecto de las micotoxinas en células animales sanas.

La razón por lo que se consideró conveniente el uso de dichas células, es que son de cáncer cervicouterino (proviene de una persona llamada Helen Lane, de ahí su nombre). Estas células ya están transformadas, lo que las hace resistentes y de manejo relativamente sencillo en el laboratorio.

Además, en esta tesis se presentarán generalidades de las micotoxinas objeto de estudio, y del uso de cultivos celulares como modelos experimentales para pruebas de toxicidad "in vitro".

Estas han sido, a grandes rasgos, las motivaciones y planteamientos originales que han conformado el presente trabajo.

Z E A R A L E N O N A .

a) Definición:

La zearalenona, también denominada toxina F-2, es un metabolito tóxico elaborado por diferentes especies del género Fusarium a saber: F. oxysporum, F. tricinctum, F. moniliforme, etc. Las especies de Fusarium se nutren de materia orgánica en descomposición abundante en la naturaleza o bien de organismos vivos, causando daños como marchitamiento y pudrición en plantas.

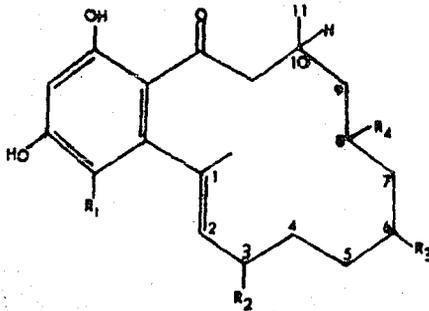
La palabra zearalenona deriva de la planta hospedera Zea (maíz) y de su estructura química: α -lactona del ácido resorcílico: en=doble ligadura y α -cetona. Su nombre científico es 6-(10 hidroxi-6oxo-trans-1-undecenil) β -lactona del ácido α -resorcílico (Urry - et al., 1966). Como su nombre lo indica, es una lactona del ácido resorcílico, cuya fórmula se encuentra en la figura 1.

La fórmula condensada de la zearalenona es $C_{18}O_5H_{22}$; tiene un peso molecular de 318.36 y un punto de fusión de 164-165°C. Es un compuesto fenólico que, iluminado con luz ultravioleta, produce una fluorescencia azul-verde (360nm) que se hace más intensa con la luz ultravioleta de onda corta (260nm) (Gillespie y Schenk, 1977).

b) Antecedentes históricos:

Esta micotoxina fue reportada por primera vez en el año de 1927, cuando granjeros del Oeste medio de Estados Unidos observaron hiperestrogenismo en cerdos y lo relacionaron con el maíz. ---

ZEARALENONA



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
ZEARALENOL	H	H ₂	OH	H ₂
ZEARALENOMA	H	H ₂	O	H ₂
8'-HIDROXIZEARALENOMA	H	H ₂	O	OH
6'8'-DIHIDROXIZEARALENOMA	H	H ₂	OH	OH
3'-HIDROXIZEARALENOMA	H	OH	O	H ₂
5-FORMILZEARALENOMA	CHO	OH	O	H ₂
7'-DEHIDROZEARALDIEHOMA	H	H ₂	O	H ₂

FIGURA 1: PRODUCTOS QUÍMICOS DERIVADOS DE LA ZEARALENOMA
(MIROCHA Y CHRISTENSEN, 1983).

contaminado por Fusarium (Mirocha et al., 1977). Gracias a Urry y colaboradores, en el año de 1966 se reportó que la causa del hiperestrogenismo era la zearalenona.

Dicha toxina ha sido encontrada en maíz, trigo, sorgo, avena, germen de trigo, cebada y otros cereales a concentraciones entre 0.1 y 2.9 mg/Yg = 0.1 a 2.9 ppm (Mirocha et al., 1977), y ha sido aislada tanto de maíz esterilizado en autoclave como de alimento peleteado, por lo que ha mostrado ser un producto termoestable (Rosiles y López, 1977).

El hiperestrogenismo en cerdos se ha reportado en China, Japón, Australia, Sudáfrica, Hungría, Rumania, Yugoslavia, Escocia, Italia, Inglaterra, Canadá y Estados Unidos (Mirocha y Christensen, 1983).

Esta enfermedad se ha presentado con mayor frecuencia - en invierno y principios de primavera, debido a que el hongo requiere de un período de temperatura relativamente bajo (8°C) para la producción de zearalenona (Christensen y Kaufmann, 1969).

Se sabe que los cerdos son los animales más afectados en la granja, ya que cuando la zearalenona ha sido consumida por ellos les ha provocado hiperestrogenismo; en cambio, cuando ha sido consumida por pavos y gallinas su efecto es mínimo o nulo. Por otro lado, en la mujer se usa un derivado de la zearalenona para evitar las molestias de la menopausia (Carvajal, 1987. Comunicación personal).

c) Metabolismo:

El período de incubación de los hongos para la producción de zearalenona es de 6-10 semanas. Se ha visto que cambios alternados en la temperatura de incubación que van de 8°C a 25°C, durante

dos semanas, dan una alta actividad estrogénica a esta micotoxina y al incubarse a 28°C se produce la más alta actividad estrogénica en ratas (Stoloff et al., 1971).

Existen otros productos metabólicos relacionados con la zearalenona, entre los que tenemos la 5-formilzearalenona y la 7'-dehidroxizearalenona (Bolliger y Tamm, 1972), la 6'8'7'-dehidroxizearaldienona (Steele et al., 1976), la 4'5'-dihidroxizearalenona (Robison et al., 1979), el -zearalenol (Hagler et al., 1979) y la 3'-hidroxizearalenona (Pathre et al., 1980), cuyas fórmulas se presentan en la figura 1.

Las diferentes especies de Fusarium que sintetizan zearalenona lo hacen a diferentes concentraciones y temperaturas. Fusarium roseum produce altas cantidades de zearalenona (3000-15000 ppm) y se desarrolla a temperaturas máximas de 24-27°C, Fusarium moniliforme sintetiza bajas cantidades de esta micotoxina (1-19 ppm) a temperaturas de 12-14°C.

La diferencia principal de la zearalenona comparada con otras micotoxinas consiste en que, dependiendo del animal al que se suministró o por el que sea consumida, ocasiona diferentes síntomas.

Los efectos de la zearalenona en los cerdos machos son la hinchazón del prepucio y del escroto, además de una disminución de la libido (Rosiles y López, 1977). Los machos jóvenes pueden presentar atrofia de los testículos y alargamiento de las glándulas mamarias (Mirocha y Christensen, 1983).

Por el impacto económico que representa, la mayor importancia de la zearalenona se debe al efecto estrogénico que produce en hembras de cerdos, manifestándose por un aumento del tamaño de la

vulva, prolapso vaginal y diversos grados de desarrollo de las glándulas mamarias en hembras recién nacidas (Rosiles y López, 1977).

Cuando se realizó un examen postmortem se observó enrojecimiento en los labios vulvares y en la mucosa vaginal observándose un exudado turbio blanquecino, los vasos sanguíneos presentaron una congestión de sangre, aunque en el cérvix esta congestión es escasa. En el resto del organismo no se presenta ningún cambio significativo (Rosiles y López, 1977).

Finalmente, al analizar los tejidos de la mucosa vaginal de cerdas hembras se encontró un enrojecimiento del epitelio hasta de 20 células en línea transversal, en algunas porciones del borde libre del epitelio, estas células se observan con una degeneración vascular y un desprendimiento de la capa de células estratificadas (Villalobos y Doporto, 1974).

La zearalenona no causa aborto, pero puede causar infertilidad, reducción en el peso del lechón y prolongación del estro (Chang et al., 1979).

AFLATOXINAS .

a) Definición:

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios tóxicos de los hongos, los cuales son elaborados por Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus. La principal toxina que producen es la aflatoxina B₁, que es la más tóxica del grupo, encontrándose

comúnmente en alimentos.

Las aflatoxinas son derivados de bis-furano-isocumarinas, las cuales se presentan en dos series designadas aflatoxinas B_1 y derivadas y aflatoxinas G_1 y derivadas, así llamadas por su característica de producir fluorescencia azul (Blue) o verde (Green) - bajo la luz ultravioleta (Figura 2).

b) Antecedentes históricos:

Las aflatoxinas recibieron este nombre por Sargeant et al., en el año de 1961, considerándoseles metabolitos del hongo Aspergillus flavus. El nombre les fue dado por su origen y por sus propiedades tóxicas, al descubrirseles como agentes etiológicos de la enfermedad que apareció en Inglaterra en 1960, a la que se le dio el nombre de "enfermedad X de los pavos" (Goldblatt, 1969).

Sin embargo, los primeros trabajos relacionados con estas sustancias fueron publicados en el año de 1953 por Baker y Jacquette, quienes reportaron una enfermedad de etiología desconocida e informaron que los primeros brotes aparecieron en el año de 1950 en los principales criaderos de pollos para engorda de algunos lugares de Estados Unidos. A esta enfermedad se le llamó "síndrome hemorrágico de las aves", debido a la presencia de hemorragias petequiales (ruptura de capilares sanguíneos), en diversos órganos.

Estos estudios fueron continuados por otros investigadores, y en el año 1954, Gray observó que, además de las hemorragias se presentaban anemia y leucemia. Washko y Mushett en el año 1955, (en Forgacs et al., 1962), hicieron un estudio detallado --

de los aspectos clínicos, hematológicos, patológicos e histológicos de esta enfermedad. Fue en 1955, cuando Forgas et al., se realizaron el papel que tienen algunas micotoxinas en la producción de esta enfermedad hemorrágica de las aves. Sus trabajos posteriores demostraron la relación existente entre las micotoxinas y el síndrome hemorrágico; algunos de estos trabajos consistieron en reproducir en el laboratorio condiciones de campo y aunque los resultados obtenidos fueron algunas veces diferentes, se concluyó que existía alguna relación entre esta enfermedad y la presencia de micotoxinas. Entre los hongos aislados se encontraron: Aspergillus flavus, Aspergillus clavatus, Penicillium citrum, Penicillium rubrum, Faecilonices variotti y especies de Alternaria. Cuando se aislaron estos hongos de alimentos húmedos que no contenían coccidiostáticos ni antibióticos y se incubaron a temperatura ambiente, produjeron sustancias tóxicas a partir de aproximadamente las 24hrs. hasta el sexto día.

Por otro lado, en los Estados Unidos de Norteamérica se encontró (Forgacs, et al., 1968) que bajo condiciones de campo, las aves de 4 a 7 semanas son las más afectadas; sin embargo, se presentaron casos de aves de 2 hasta 12 semanas de edad, dependiendo del grado de humedad de la cama (lugar de cemento con paja donde están las aves).

Forgacs et al., en 1962 aislaron en condiciones de laboratorio, hongos de lugares donde se presentó el "Síndrome hemorrágico de las aves". Estos hongos proliferaron rápidamente en el alimento que se encontraba en la cama húmeda de las aves, formando sustancias tóxicas.

Asplin y Carnaghan, en 1961 estudiaron los efectos tóxi -

cos de algunas micotoxinas en patitos y pollitos. Brown, en 1965, señaló los daños que se producían en el hígado de aves intoxicadas con aflatoxinas.

Por algún tiempo se consideró que Aspergillus flavus y Penicillium puberulum estaban involucrados en la producción de aflatoxinas (Pippi et al., 1980); actualmente se sabe que las aflatoxinas son producidas sólo por Aspergillus flavus y Aspergillus parasiticus.

El Aspergillus flavus puede localizarse en los cereales (Shotwell et al., 1969), principalmente en maíz, trigo y arroz, que son los granos más comúnmente contaminados (Krogh et al., 1974), en semillas de algodón, cártamo y copra (Krogh et al., 1970 en Krogh et al., 1974) y también en los cacahuates, pastas de coco y en todo tipo de nueces y piñones (Stoloff y Dalrymple, 1976), etc. Puede crecer en toda clase de materiales de origen animal (jamones y otros productos cárnicos), en vinos, quesos, etc. También, se le ha observado en insectos, incluyendo gorgojos, y algunas veces parasitando a las abejas (Christensen y Nelson, 1976).

Los factores que determinan si crece o no un hongo, son el contenido de humedad, la temperatura y el tiempo. Para que Aspergillus flavus pueda producir aflatoxinas debe estar presente en cultivo puro; en caso de que estuviera acompañado por levaduras, hongos filamentosos o bacterias, habría poca o ninguna producción (Christensen y Nelson, 1976).

Estas toxinas pueden estar contenidas dentro del micelio de la spora o pueden ser secretadas hacia el sustrato sobre el cual los hongos se desarrollan (Pier, 1973).

Para la producción de estos metabolitos se requieren las siguientes condiciones para el crecimiento del hongo:

1. Cantidad adecuada de carbohidratos en forma disponible o sea el sustrato.
2. Humedad relativa de 10 a 18% en el sustrato.
3. Temperatura entre 12°C mínima, 40°C máxima y 27°C óptima.
4. Disponibilidad de oxígeno en el medio. Bajo condiciones normales el oxígeno no es un factor limitante.
5. Un pH relativamente elevado (9.0).
6. La especie y cepa de Aspergillus flavus o Aspergillus parasiticus invasor. Sólo ciertas cepas son potencialmente productoras de toxinas.

Para su identificación en el laboratorio, las aflatoxinas se separan por cromatografía de capa fina (CCF) y se comparan con los estándares de la aflatoxina pura. Hay diferentes fracciones cromatográficas, tales como B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2a}, G_{2a} y P₁, en planos cromatográficos.

Son solubles en cloroformo y termoestables; se descomponen con la luz, por lo que deben protegerse guardándolos en envases oscuros y en congelación.

Estos metabolitos ejercen su papel patógeno a través de

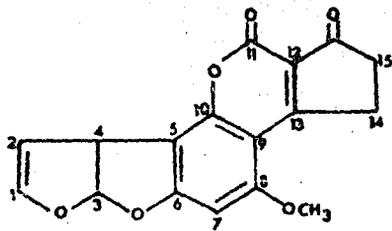
la supresión de la síntesis de ARN-mensajero a nivel celular (Fück y Osweiler, 1976). De esta forma, existe una inhibición en la síntesis de proteínas, especialmente en el tejido hepático, lo que provoca degeneración grasa y necrosis hepática como primeras lesiones. Asimismo, se presentan trastornos en el desarrollo normal de la inmunidad adquirida. Clínicamente se observa un cuadro poco sugestivo, aunque hemorragias generalizadas se reportan con frecuencia (Flood y Henderson, 1969; Shreeve et al., 1975).

La aflatoxina B₁ es la más tóxica de las cuatro, tiene propiedades carcinógenas y es capaz de producir hepatomas en ratas, cuyes, ratones, hámsters, trucha arcoiris, etc. (Goldblatt, 1969); esta aflatoxina tiene la fórmula estructural presentada en la figura 2.

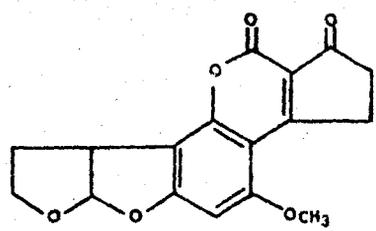
c) Metabolismo:

Cuando las aflatoxinas son administradas a animales, el compuesto puro o sus derivados aparecerán en la orina, las heces fecales y la leche. Experimentos llevados a cabo suministrando una sola dosis de aflatoxina B₁ radioactiva, demostraron que la rata y el ratón la excretan en 80 y 90% respectivamente, en las primeras 25hrs; en estas especies, las rutas biliar y fecal son las de mayor excreción, o sea, representan más del 65% del total excretado. El resto es excretado a través de la orina (Wogan, 1969).

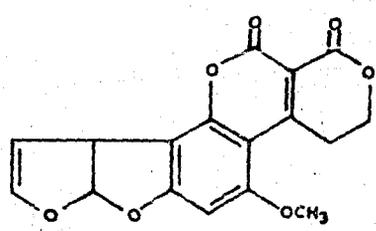
Sawhney et al., en 1973, experimentando con gallinas ponedoras White Leghorn, establecieron que las aflatoxinas o sus metabolitos son eliminados, principalmente, a través de las excreciones biliares.



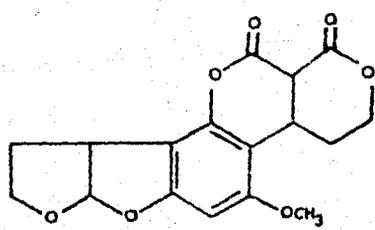
AFLATOXINA E₁



AFLATOXINA B₂



AFLATOXINA G₁



AFLATOXINA G₂

FIGURA 2: ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS AFLATOXINAS .

Horland y Cardeillac (1975) inyectaron, en la vena de gallinas anestesiadas y con los uréteres y conductos biliares canulados, aflatoxinas marcadas con C^{14} y verificaron que la vía más importante de excreción era la bilis. Las cantidades excretadas por la bilis, orina y contenido intestinal, mantuvieron una relación constante de 70:15:15, respectivamente, en un período de observación de 315min. También, mostraron que en el hígado, riñón y médula ósea se concentra más la aflatoxina que en el encéfalo, músculo y grasa corporal. La concentración radioactiva en estos tejidos, y su liberación en el plasma, probablemente afecta las concentraciones en la bilis, después de la separación del plasma inicialmente. Los hallazgos de radiactividad en el contenido intestinal, también indicaron que la aflatoxina se elimina por el intestino como ruta excretora. Los mismos autores estimaron que si el C-17 es el único carbono de la aflatoxina eliminado como CO_2 , entonces un 6% de la aflatoxina administrada es eliminada por los pulmones.

Se ha demostrado (Savhney *et al.*, 1973) en aves, que las aflatoxinas se difunden por todos los tejidos corporales, y tienen rápida absorción, pero lenta eliminación. El primer día el hígado, los órganos reproductores y los riñones tienen una elevada concentración de aflatoxinas, lo cual es factible suponer se debe al papel que juegan estos órganos en la eliminación de las toxinas. Siete días después del tratamiento, un 70.6% de la dosis administrada fue recuperada en el excremento, lo que pone en evidencia su escasa eliminación. La alta concentración en las partes anteriores de los aparatos digestivo y circulatorio de las aves, como son los esófagos y el proventrículo muscular sugiere una lenta absorción por estos segmentos del aparato digestivo y circulatorio. El intestino mostró una alta concentración de la toxina debido

a la constante eliminación del compuesto o de sus metabolitos por la bilis. Estos resultados demostraron que todos los componentes del huevo y partes comestibles de la canal, contenían diferentes concentraciones de aflatoxinas (Sawhney et al., 1973). La presencia de la toxina en músculos esqueléticos de gallinas ya había sido reportada anteriormente (Van Zytveld et al., 1970).

Mabee y Chipley (1973), en un experimento de 14 días de duración, intubaron el igluvies de pollos para engorda y luego los intoxicaron con aflatoxina marcada con C^{14} . Los resultados se hallaron que las aves retuvieron la décima parte de la dosis administrada y su distribución fue la siguiente: músculos pectorales 31.77%, músculos 30.63%, molleja 12.52%, sangre 11.04%, hígado 9.83%, corazón 4.3%. A pesar de estos hallazgos, los autores consideraron que no hubo efectos tóxicos en los pollos de engorda.

Es bien sabido que las aflatoxinas influyen sobre la sin tesis de proteínas. Entre los investigadores que han demostrado estos efectos se encuentra Smith (1963), quien observó que bajas concentraciones de aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 , G_2 , inhibían la incorporación de leucina marcada con C^{14} a la proteína.

En una revisión hecha por Wogan en 1969 sobre los efectos bioquímicos de las aflatoxinas en animales, menciona que la aflatoxina B_1 causa serias alteraciones en la síntesis proteica y de ácidos nucleicos en el hígado, cuando son administradas a ratas en dosis elevadas. La inhibición de la síntesis del ADN y ARN nuclear y las alteraciones de la transcripción genética, aparecen inmediatamente después de que el compuesto es administrado.

Los experimentos de Clifford y Vasa (1966) indicaron que

después de una hora de la ingestión de aflatoxina, ya hay inhibición de la síntesis proteica "in vitro" en la incorporación del ácido orótico (factor de crecimiento para muchos microorganismos y útil en la biosíntesis de ácidos nucleicos) en el ARN, mientras que hay inhibición del arrovechamiento de la leucina en la proteína, o sea, que no hay impedimento en la incorporación del ácido orótico en el grupo de nucleótidos, pero sí hay una marcada inhibición en la colocación de los nucleótidos precursores en el ARN nuclear. Los resultados indicaron que hubo una inhibición en la ARN-polimerasa, la única enzima que actúa entre estos dos estadios. Los autores sugieren la siguiente secuencia de eventos, en el curso de la intoxicación con aflatoxina E_1 : a) la aflatoxina, después de entrar en las células hepáticas, penetra en el núcleo; b) se une con el ADN y, de este modo, inhibe la ARN-polimerasa; c) reduce la síntesis del ARN; d) la inhibición del ARN-mensajero se refleja después de 15 minutos, en la reducción de la síntesis proteica; e) la continuada reducción de la producción de ARN-mensajero es la causa de la pérdida de la granulación del retículo endoplásmico.

A pesar de ser aceptada como un hecho por la mayoría de los investigadores, la acción de la aflatoxina como inhibidor de la ARN-polimerasa, en los estudios hechos por King y Nicholson (1967) se observó que la aflatoxina E_1 no tuvo efecto en la síntesis del ARN.

T R I C O T E C E N O S .

a) Definición:

Los tricotecenos son un grupo de metabolitos químicamente activos y relacionados, provenientes de varios especies de hongos.

gos como Fusarium, Myrothecium, Trichoderma, Cephalosporium, y Stachybotrys (Brain et al., 1946 en Rodricks et al., 1977).

Los tricotecenos contienen carbón, hidrógeno y oxígeno. Son estructuras que tienen un sistema de anillo llamado tricotecano, comprendiendo una familia de sesquiterpenoides estrechamente relacionada. Todas estas toxinas que ocurren naturalmente contienen un enlace olefínico (doble enlace que poseen en su molécula las olefinas o hidrocarburos alifáticos y acíclicos que corresponden a la fórmula general C_nH_{2n}) en los C-9,10; además tienen un grupo epoxi en los C-12,13, mismos que pueden ser caracterizados como 12,13 epoxitricotecenos; biogénicamente, son derivados del farnesil pirofosfato por medio de un proceso que incluye una doble migración 1,2 metil (Jone y Lowe, 1960 en Rodricks et al., 1977).

b) Antecedentes históricos:

Los primeros compuestos de tricotecenos aislados fueron las verrucarinas, cuando se trataba de encontrar sustancias anti bióticas en 1946 (Brain et al., 1946). El diacetoxiscirpenol(DAS) fue el primer tricoteceno fitotóxico aislado (Brain et al., 1946 en Rodricks et al., 1977).

Dado que los Fusarium y otros hongos afines infectan importantes productos alimenticios, estos se asocian con intoxicaciones de humanos y de animales en todo el mundo (Woronin, 1891 en Rodricks et al., 1977).

En los años de 1942, principalmente en 1944, alrededor del 10% de la población de Orenburgo, cerca de Siberia, fue afectada por micotoxinas del mijo, trigo y cebada que habían sido almacenados como provisión de alimento para el invierno. Los sínto

mas fueron vómito, inflamación de piel, diarrea, úlcera necrótica (inflamación y posteriormente muerte del tejido localizado en las amígdalas o partes adyacentes), septicemia (invasión de bacterias en la sangre) y agotamiento de la médula ósea. A este tipo de intoxicación se le dio el nombre de "Aleukia tóxica alimentaria" - (ATA). Aunque una investigación posterior había demostrado la presencia de un producto esterooidal derivado de Fusarium sporotrichioides y de Fusarium rosei, se ha demostrado que hay tricotecenos producidos por dichos hongos (Ueno et al., 1972 b en Rodricks et al., 1977).

En 1931, se desarrolló en Ucrania (URSS) una intoxicación masiva de caballos, cerdos, aves y becerros; se recuerdan casos similares en Europa Central (Mirocha y Pathre, 1973). Los principales síntomas fueron shock, estomatitis, necrosis dérmica y hemorragia, leucopenia (disminución de leucocitos), desórdenes nerviosos y muerte debida a fallas respiratorias. Se sabe que esta intoxicación tuvo relación con Stachybotrys alternans de forrajes mohosos.

Sarkisov, en 1947, atribuyó a Stachybotrys alternans la causa de una enfermedad fatal que afectó a las gallinas durante los años de 1940 a 1946. Se han reportado brotes epidémicos de este tipo de intoxicación en Hungría (Palyusik, 1970 en Rodricks, et al., 1977). Al igual que en el caso del principio tóxico de la estaquibotriotoxicosis, ya se han aislado derivados macrocíclicos de dialactona de la familia de los tricotecenos (Eppley 1975, 1978).

Una enfermedad etiológicamente desconocida que afectó a caballos, se desarrolló durante muchas de las décadas pasadas en la provincia de Hokaido, desde el norte de Japón (Kawishi y -

Ichijo, 1970 en Rodricks et al., 1977). Esta provincia es conocida por sus criaderos de caballos y cultivos de frijol. Durante el invierno, los caballos son alimentados con vainas de frijol secas. Se observó una alta incidencia de la enfermedad desde el invierno hasta inicios de la primavera, cuando se usaban de alimento las vainas de frijol, siendo los síntomas de envenenamiento, convulsión, movimientos cíclicos, perturbaciones respiratorias, disminución en el ritmo cardiaco y reflejos retardados. Del 10 al 15% de los caballos afectados murieron en período de 2 a 3 días. Los análisis de laboratorio han demostrado un alto grado de contaminación en las vainas por el neosoleanol y la toxina T-2, que son producidos por hongos tales como Fusarium solani (Ueno et al., 1972 a en Rodricks et al., 1977).

Otro tipo de intoxicación animal que se ha reportado en la literatura rusa, aparece correspondiendo a intoxicación por tricotecenos. Esta enfermedad, "dendrochiotoxicosis", fue causada por productos alimenticios enmohecidos con Dendrochium toxicum y se observó en caballos, ovejas y cerdos. Se sabe que D. toxicum es sinónimo de Mycrothecium roridum, lo que sugiere que los compuestos macrocíclicos roridinas y las verrucarinas son los tóxicos en este caso.

En el verano de 1923, en la Rusia europea, se registraron daños en la producción de cereales causados por Fusarium roseum (Dounin, 1934 en Rodricks et al., 1977). Además, el pan preparado con centeno mohoso produjo, a quienes lo consumieron, vértigo, dolor de cabeza y vómito. En los Estados Unidos, 1929, informaron sobre casos de intoxicación por ingerir cereales mohosos. Publicaciones más recientes reportaron serios problemas en Illinois, relacionados con la ingestión de maíz mohoso por el ganado (Gilgan et al., 1966 en Rodricks et al., 1977), y se investigó un principio tóxico de Fusarium tricinctum, aislado de maíz. Así -

lograron aislar la principal toxina en forma cristalina, la cual indujo severos edemas y hemorragias intradérmicas cuando fue aplicada en la piel de ratas. Análisis posteriores mostraron que el agente tóxico causal fue la toxina T-2, un tricoteceno.

En Japón son conocidos envenenamientos similares causados por cereales mohosos (Ueno et al., 1971 a en Rodricks et al., 1977). El moho rojo o "roña del trigo" es bien conocida como una enfermedad de este cereal y del mijo, avena y centeno.

Dicha enfermedad ha causado severos daños a los cultivos de cereales en muchos años y ha llegado a afectar un tercio de la producción anual del país. Si estos cereales mohosos son usados como alimentos para humanos o como forrajes, puede desarrollar enfermedades severas. Los síntomas incluyen vómito y diarrea en el hombre; rechazo al alimento en caballos, además de congestión o hemorragia en pulmones, glándulas suprarrenales, intestino, útero, vagina y cerebro de los animales. Estos problemas están estrechamente relacionados con épocas de fuertes lluvias con clima frío. En 1971, investigadores como Ueno revelaron que los tricotecenos tóxicos, tales como el nivaleol y la fusareno-na-X de Fusarium nivale, podían ser aislados a partir de la cebada mohosa (Tatsumo et al., 1968 en Rodricks et al., 1977).

Con estas consideraciones históricas y etiológicas, las intoxicaciones mencionadas en humanos y en animales pueden ser atribuidas a las micotoxinas de la familia 12, 12-epoxitricoteceno (Ueno et al., 1971 b en Rodricks et al., 1977).

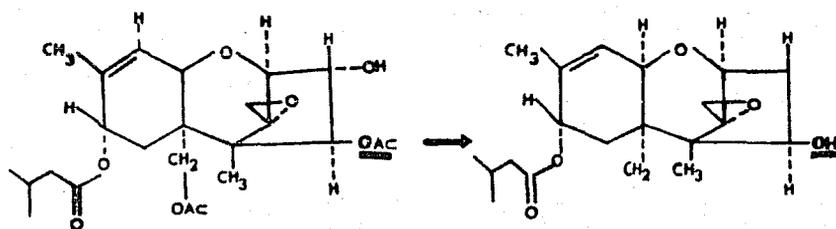
c) Metabolismo:

Los patrones de excreción y distribución de la fusareno-na-X

marcada y de la toxina T-2 (Ueno et al., 1971; Ueno et al., 1976) han sido estudiados. La fusarenona-X inyectada subcutáneamente en ratones, fue rápidamente absorbida del sitio donde la inyección se aplicó, distribuyéndose en hígado, riñón, intestinos y otros órganos de estos animales. Alrededor del 25% de la radiactividad total fue eliminada en la orina en poco menos de 24hrs; la toxina T-2 marcada administrada a ratones y a ratas fue distribuida al hígado, riñones e intestinos, eliminándose principalmente en las heces. Uno de los compuestos radiactivos en las heces fue identificado como toxina HT-2. Varios experimentos con subfracciones de hígado de rata revelaron que las toxinas fusarenona-X y T-2 fueron diacetiladas en el C-4 por esterificación microsomal, produciendo las toxinas nivalenol y HI-2 (figura 3), respectivamente (Cata y Ueno, 1976). Estos hallazgos indican que son metabolizados por enzimas del hígado dentro de productos diacetilados, los cuales son eliminados en las heces.

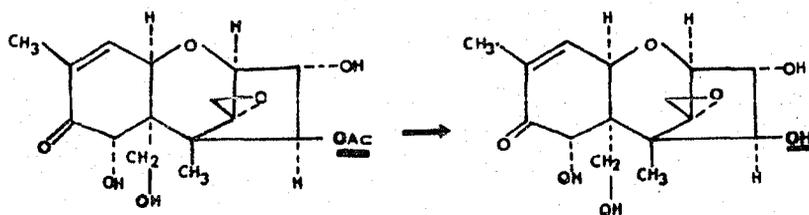
La leucopenia es uno de los síntomas más característicos de la enfermedad denominada "Aleukia tóxica alimentaria" (ATA) (Meyer, 1953). En la toxicosis causada experimentalmente por un aislamiento de Fusarium solani, un producto de la toxina T-2 y de neosolaniol, causaron una marcada leucopenia en gatos (Sato et al., 1975). Además, la administración repetida de la toxina T-2 a una dosis de 0.05 a 0.1mg/Kg causó una severa leucopenia en gatos. Los leucocitos contados fueron de 10-30% (2000 - 6000/mm³) de valores controlados una semana después del tratamiento. La leucopenia fue acompañada por anemia.

De acuerdo con Wyatt et al., 1975 (en Rodricks et al., 1977), una dieta diaria de 20mg/g causó leucopenia en gallinas ponedoras. Rusch y Staehelin, 1965 (en Rodricks et al., 1977) reportaron que los productos tóxicos metabólicos verrucarinas -



TOXINA T-2

TOXINA HT-2



FUSARENONA-X

NIVALENOL

FIGURA 3: DIACETILACIÓN MICROBOSOMAL DE TRICOTECENOS
(RODRICKS ET. AL., 1977).

y los diacetoxiscirpenol indujeron leucopenia en algunos animales de laboratorio, con dosis, alrededor de 0.1mg/Kg diarios - por pocas semanas.

Por otro lado, Lindenfelser et al., (1974) reportaron sinergismo entre la toxina T-2 y la aflatoxina B₁, en una toxicidad aguda de ratón. De acuerdo a datos reportados (Sato y Leistner, 1976 en Rodricks, et al., 1977), la toxicidad letal de la toxina T-2 y la ocratoxina A, fueron sinérgicamente aumentadas bajo administración simultánea. Además, la combinación de toxina T-2 y ocratoxina A originaron una mortandad en pollos jóvenes a las 3 semanas de administrar alimentos con dosis no letales (20mg/g diarios de toxina T-2 y 8mg/g diarios de ocratoxina A). Estos descubrimientos sugieren que la toxicidad de tricotecenos puede ser aumentada por el tratamiento simultáneo con otras micotoxinas.

CULTIVO DE TEJIDOS .

a) Definición:

El término "cultivo" de tejidos fue originalmente aplicado al cultivo "in vitro" de fragmentos en suspensión de tejidos desmenuzados, o a los "explantes" de tejidos embebidos en plasma coagulado. Después, el término vino a asociarse en general, con el cultivo de células "in vitro". Cultivo de tejidos es desusado en su sentido original y no es lógico perpetuar el uso general del término.

El término cultivo celular se refiere al tejido disociado hasta obtener una suspensión de células aisladas, ya sea mecánica o más fácilmente, con la ayuda de enzimas proteolíticas. Después de lavar y contar las células (en un hemocitómetro) se les permite asentarse en la superficie plana de un recipiente de vidrio o plástico, al cual se adhieren rápidamente. En condiciones óptimas se dividirán aproximadamente una vez al día, hasta que la superficie se cubra con una capa confluyente de células, (Hayflick, 1975).

Las células de los organismos multicelulares en cultivos de tejidos, transferidas periódicamente a un medio fresco controlado, brindan una oportunidad única para estudiar el crecimiento celular y los procesos de envejecimiento.

Se han cultivado con éxito células de distintos tejidos animales y vegetales en ausencia de cualquier otro forma de vida. En un medio de cultivo típico para células de tejidos animales,

plasma representa el sustrato de fijación de las células y generalmente se utiliza como alimento un extracto de embrión, aunque actualmente se utilizan con amplitud medios sintéticos como los de las células HeLa (Waymouth, 1965; Paul, 1970). Periódicamente deben lavarse las células para eliminar los productos metabólicos de desecho. En estas condiciones las células tisulares pueden vivir, crecer y dividirse a velocidad constante año tras año y seguir viviendo, llenas de vigor, muchos años después de que se hubiera muerto normalmente el animal de donde proceden. Por ejemplo, Carrel aisló un trozo de corazón de pollo y lo observó vivo en cultivos de 1913 a 1946, cuando dio por terminado el experimento sin que hubiera muerto el tejido, sin embargo, se ha demostrado que se añadieron fibroblastos nuevos a los extractos embrionarios nutritivos, y que fueron estas células las que hicieron posibles la multiplicación, al parecer indefinida, de células en cultivo "in vitro" (Hayflick, 1975).

Cuando se disocian células de tejidos se pueden obtener clones de células únicas, tal como se puede hacer con microorganismos (Puck, 1972). Estos cultivos son de gran valor para el estudio de distintos problemas. Indican que las células del hombre, igual que las de pollo, crecen rápidamente y se multiplican indefinidamente si disponen de alimentos y condiciones adecuadas y si se eliminan los productos de desecho; se han realizado estas investigaciones con células epiteliales y fibroblastos (Paul, 1970; Cameron y Thrasher, 1971). Se dispone ahora de medios de cultivo sin proteínas para satisfacer estas necesidades de investigación (Eagle, 1960; Katsuta y Takeoka, 1973). Sin embargo, sólo se han adaptado unos cuantos tipos celulares de crecimiento en medios definidos. En algunos casos, el medio condicionado por el crecimiento previo de las células puede servir para otras células no adaptadas previg

mente. Pero para la mayor parte de los cultivos de tejidos, el suero sigue siendo un constituyente necesario. Se ha intentado aislar un factor de crecimiento neural que estimula la duplicación del ADN en los fibroblastos, las células epidérmicas del pollo (embrionarios) y las células L 373, de ratón.

"In vivo", el ritmo de crecimiento del epitelio mamario del ratón disminuye durante la propagación en serie, pero esta disminución es proporcional al número de divisiones celulares. Las células humanas en cultivos de tejidos tienen también capacidad limitada para multiplicarse. En la transferencia seriada de células embrionarias en cultivo de tejidos, se observó que disminuía el número de divisiones (Daniel y Young, 1971), y se realizó un máximo de 50 duplicaciones de población, aproximadamente, antes de que las células dejaran de dividirse. Si se congelan muestras de células en diversas etapas después del aislamiento a partir de un embrión, y a continuación se reconstituyen en el medio de cultivo, terminan sólo lo que queda de sus 50 ciclos, aproximadamente, de duplicación (Hayflick, 1975).

La supuesta inmortalidad de las células en cultivo celular se basa al parecer, en un error técnico en los cultivos de fibroblastos de pollo de Carrel. Más bien, parece que las células de los tejidos adultos de organismos multicelulares se activan para dividirse al sufrir una lesión el organismo. La proliferación celular inducida de esta manera hace posible la reparación de la lesión y se produce una cierta extensión en organismos multicelulares. Quizá las células que eran capaces de proliferar tienen aún una reserva de duplicación que queda latente en el momento en que se entra en reposo (Mc Vinn, 1969).

Se ha observado que el número de duplicaciones celulares restantes para las células en cultivo de tejidos es inversamente proporcional a la edad de los adultos de donde se tomaron las células.

las. Casi todas las células del cuerpo humano dejan probablemente de duplicarse antes de que se agoten sus reservas, y algunas quizá muy pronto. La duplicación se conserva detenida probablemente por sustancias que retrasan la división y que son secretadas por las propias células tisulares por mecanismos inmunológicos (Hayflick, 1975).

En ciertas condiciones, una célula que se encuentra estática (que no crece ni se divide), empieza a presentar crecimiento y división activos, formando un tumor o crecimiento canceroso (Todaró y Badlett, 1966). El cáncer es el resultado de la proliferación sin control de células no diferenciadas de un tejido. El cáncer puede estar localizado en una cierta zona o formar metástasis (extenderse por vía linfática o sanguínea) en todas las regiones del organismo. Las células no diferenciadas se multiplican y alteran la organización de los tejidos en donde se localizan. Las células cancerosas no parecen ser netamente diferentes en la estructura nucleolar o nuclear fina o en la síntesis macromolecular y bioquímica (Busch, 1962). Para impedir o curar el cáncer, se tendrá que aprender a conocer la naturaleza del mecanismo por el cual el organismo frena normalmente el crecimiento y la división de sus células.

En los tejidos normales del mamífero adulto se alcanza un estado de equilibrio en el cual se detienen las mitosis, salvo en algunos tejidos especiales como el epitelio germinativo de la piel, las capas gametógenas de las gónadas y la médula ósea productora de glóbulos rojos. Esta inhibición de la división celular parece debida a productos fabricados por los propios tejidos, que en conjunto reciben el nombre de chaloneas (Busch, 1962). Cada tejido parece producir dos variedades de chaloneas, una de bajo peso molecular y otra de alto peso molecular. Estas se son citotóxicas, y sus

efectos se invierten al volver a las condiciones iniciales. Si se lavan las células de un cultivo de tejido, para eliminar las chalonas del caso, vuelven a detenerse las mitosis. Se han aislado chalonas de quince tejidos; parecen poder regular la proliferación celular en los tejidos, y se piensa que las chalonas se fijan a focos receptores específicos de las membranas celulares para ejercer desde ahí su efecto inhibitor mediante un mecanismo desconocido. Mientras no se disponga de chalonas en forma pura, será difícil establecer su mecanismo de acción. En los tumores benignos, se producen menos chalonas, y en lugar de fijarse a los focos receptores, pasan a la sangre; de ahí la paradoja de que la sangre que proviene de un tumor maligno contenga más chalonas que la que proviene de una zona normal equivalente (Bullough y Laurence, 1970).

En la actualidad, el cáncer es tratado con varias técnicas que tienden solamente a abolir su crecimiento cuando ya se ha iniciado.

Como ya se ha mencionado, el cultivo de tejidos es un arma valiosa, ya que al no poderse experimentar directamente con seres humanos, nos ofrece la posibilidad de conocer el crecimiento, las posibles lesiones, y el envejecimiento celular. Como en este caso, los daños causados por la aplicación de micotoxinas.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Establecimiento del Cultivo Celular .

a) Cultivos de células usados .

La línea celular HeLa, establecida por Gey y colaboradores (Gey et al., 1951) de carcinoma cervicouterino humano, fue el avance más importante que se tuvo para aislamiento viral y observación de efectos tóxicos de diferentes sustancias.

Las células HeLa fueron obtenidas de ampolletas congeladas en nitrógeno líquido a una temperatura de -170°C y del subcultivo (pase) número 69 (P-69), del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) .

La línea celular BGM, proviene de riñón sano de mono verde africano. Las siglas corresponden a Buffalo Green Monkey (referente al lugar donde se adaptaron por primera vez a línea celular.

Las células BGM fueron obtenidas de ampolletas congeladas en nitrógeno líquido a una temperatura de -170°C y del subcultivo número 196 (P-196), del INER.

b) Esterilización del material .

El material de vidrio usado, se lavó perfectamente con detergentes no tóxicos, como 7X o bien Extran al 0.2% y se enjuagó por lo menos 10 veces con agua destilada. Posteriormente, fue esterilizado en autoclave, marca Metron, durante 20 min. a 121°C .

Para la desinfección de la zona de trabajo (campana de flujo laminar horizontal, marca Veco), se limpió perfectamente bien con alcohol al 70%, usándose cubreboca para evitar la contaminación por flora bucal, como el micoplasma que causa serios problemas en -

en los cultivos celulares.

c) Medios y enzimas utilizados .

Las células HeLa se desarrollaron en medio de cultivo número 199 (M-199), el cual es un medio específico para dichas células, que consta de lo siguiente:

L-arginina HCl	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
L-lisina HCl	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
L-histidina HCl	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
L-valina	NaHCO_3
DL-alanina	Biotina
Glicina	Colina
L-metionina	Acido fólico
L-treonina	Nicotinamida
DL-ácido aspártico	Pantotenato de Calcio
DL-leucina	Piridoxal
L-isoleucina	L-tirosina
DL-triptofano	L-cisteína
L-fenilalanina	Tiamina HCl
L-serina	Inositol
L-prolina	Tocoferol fosfato
DL-ácido glutámico	Riboflavina
L-hidroxiprolina	Acido ascórbico
L-glutamina	Hioxantina
L-cisteína HCl	Rojo fenol
L-asparagina	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$
piruvato de Na	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Glucosa	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Glucanolactato	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
NaCl	$\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
KCl	

El medio M-199 , así como todos los demás reactivos, se guardaron en refrigerador , marca Lab-Line Company ; el medio en solución stock (original) 10X, es decir 10 veces concentrada, marca Microlab, se diluyó 1:10 con agua destilada y esterilizada para tener un volumen final de 100ml.

Se agregaron directamente al medio, 10ml de suero fetal de ternera, marca Microlab, el cual contribuye al enriquecimiento nutricional del medio.

Se añadió 1ml de bicarbonato en solución stock al 4.4%, marca Microlab, el cual sirve para ajustar a un pH neutro, haciendo que el medio tome un tono anaranjado, correspondiente al papel indicador de pH . Finalmente, se agregó 1ml de antibac, marca Microlab, el cual es una mezcla de antibióticos con base de penicilina-streptomicina que sirve para evitar cualquier contaminación bacteriana. Se agitó perfectamente. Todo esto se realizó en la campana de flujo laminar horizontal en condiciones de esterilidad.

Una vez preparado el medio de cultivo, se guardó en la estufa, marca Precisión , a 37°C para que al momento de usarlo, el cultivo celular no sufra un cambio brusco de temperatura.

Las células BGM se desarrollaron en medio de cultivo MEM - Eagle, el cual consta de lo siguiente:

CaCl ₂	200mg
KCl	400mg
MgSO ₄	200mg
NaCl	600mg
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140mg
Glucosa	1000mg

Ac. succínico	160mg
L-arginina	21mg
L-cistina	16mg
L-histidina	15mg
L-isoleucina	25mg
L-lisina HCl	36mg
L-metionina	8mg
L-fenilalanina	17mg
L-treonina	24mg
L-triptofeno	4mg
L-tirosina	18mg
L-valina	24mg

Para la preparación del medio MEM- Eagle , se procedió de la misma manera que para el medio M-199 .

Varias enzimas proteolíticas degradan selectivamente los enlaces peptídicos de algunas proteínas localizadas en la membrana de células de cultivos celulares, dispersándolas sin causarles daño. Un tratamiento proteolítico prolongado en ocasiones causa la muerte

celular, por tal razón, se recomienda que sólo se utilicen con un mínimo de exposición, únicamente para dispersar la monocapa. Algunos procedimientos utilizan una combinación de enzimas proteolíticas con agentes quelantes del tipo EDTA (ácido etilendiaminotetracético), citrato de sodio, etc., esto proporciona una mayor dispersión celular y una mayor viabilidad de las mismas.

La tripsina es la enzima más usada para este fin, pero se ha observado que el preparado crudo de ésta, por lo general, contiene otras enzimas proteolíticas, particularmente, elastasa, que se ha demostrado contiene una mayor actividad que la propia tripsina; la tripsina cristalizada es, relativamente, menos activa, - por lo que se ocupa principalmente en cultivos primarios o frescos (Phillips, 1972) .

Para una disgregación completa del cultivo celular, se recomienda que la solución de la enzima sea preparada con un buffer libre de iones Ca^{++} y Mg^{++} , ya que la presencia de estos, disminuye la estabilidad de la actividad enzimática .

Como se mencionó anteriormente, el uso de agentes quelantes en la solución de la enzima contribuye a la disociación de enlaces catiónicos, los cuales estabilizan los puentes intercelulares, por lo cual la eficiencia del tratamiento es mejor .

En este trabajo, se utilizó la tripsina, marca Microlab, a una concentración de 2.5% .

- d) Preparación de las botellas Falcon o de Leche, para los cultivos celulares.

Se obtuvo una ampollita de células HeLa o BGM del tanque de nitrógeno, se descongeló rápidamente sumergiéndola en agua a 37°C. Una vez descongelada, se vertió en una botella Falcon agregando inmediatamente el medio de cultivo previamente preparado; se agitó

suavemente y se colocó en forma horizontal. Se incubó durante 2 o 3 días en una incubadora de CO_2 , marca Napco 5100, a 37°C ; transcurrido este tiempo y cuando se observó al microscopio invertido, marca Reichert BioStar, una capa confluyente (formación de una monocapa celular adherida al cristal) se seleccionó al microscopio la botella para subcultivar (observando que estuviera en buenas condiciones, es decir, a pH neutro, sin cambios morfológicos y la monocapa confluyente).

Enseguida se retiró el medio de la botella, decantándolo y se agregó 1.5ml de tripsina al 2.5% precalentada a 37°C , en una botella Falcon de 25cm^3 ; para una botella Falcon de 10cm^3 , se agregó 0.5ml de la misma solución, agitándose suavemente para lavar la monocapa, se retiró inmediatamente por decantación.

Se volvió a agregar 1.5ml de tripsina y después de 1 a 2 minutos dentro de la incubadora, se observó la botella al microscopio; se decantó la tripsina, si se observaba un redondeo de las células, es decir, que se estaban desprendiendo, se agregó 1.0ml más; se repitió la misma operación. Una vez que las células estuvieron completamente redondas, se decantó la tripsina, se agregaron 5ml del medio (M-199 para HeLa y MEM-Eagle para BGM) y se agitó para obtener una suspensión homogénea de células.

Se observó al microscopio que no quedaran conglomerados de células, ya que esto impide el buen desarrollo del nuevo subcultivo.

Se hizo una suspensión con el medio tomando 1ml para cada botella correspondiente y con el volumen abajo indicado:

Tipo de Botella	Area utilizable	ml de medio
Roux	75 cm^3	50
Falcon	25 cm^3	15
Ensayo	5 cm^3	1

Se tataron las botellas, sin apretar el tapón de rosca para facilitar el intercambio gaseoso y se incubaron a 37°C en la incubadora. La capa estuvo confluyente en 2 o 3 días.

2. Micotoxinas Usadas .

Se realizaron varios experimentos probando diferentes concentraciones en distintos volúmenes de micotoxinas, Zearalenona, Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ y G₂, Tricotecenos: Deoxinivalenol (DON) y Diacetoxiscirpenol (DAS), hasta lograr resultados satisfactorios, es decir, añadiendo volúmenes con concentraciones que no fueran ni muy bajas, de tal manera que no afectaran en lo absoluto al cultivo celular, ni muy altas que lo destruyeran por completo .

La zearalenona y los tricotecenos (DON y DAS) se aplicaron a concentraciones de partes por millón (ppm) y las aflatoxinas se aplicaron a concentraciones de partes por billón (ppb) .

3. Cuenta Celular .

En un tubo de vidrio, marca Pyrex, de 13x100mm se añadieron ml de colorante supravital, es decir, que permite tefir específicamente diferentes organelos celulares sin causar la muerte de ellos, dando como resultado un valor real de la viabilidad, ya que aquellas células que no se tifieron serían la población muerta. El colorante fue rojo neutro precalentado a 37°C en la estufa y se mezcló con 0.8ml de la suspensión celular.

Se mezcló perfectamente y se esperó de 5 a 10min. y se llenó la cámara cuenta glóbulos (hemocitómetro) de Neubauer, marca Ievi plane, se esperó de 1 a 2 min. a que se sedimentaran las células; se contaron al microscopio óptico, marca Zeiss, las células de los 5 cuadros grandes (figura 4), incluyendo las células sobre las líneas de arriba y de la derecha.

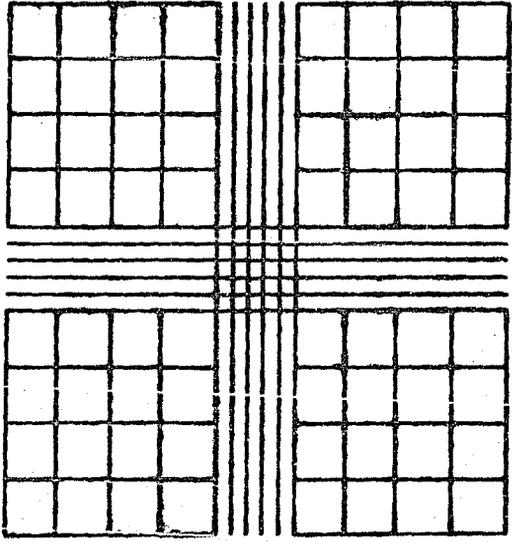


FIGURA 4: DIAGRAMA DE LA CÁMARA DE NEUBAUER.

Figura 4. Diagrama de la Cámara de Neubauer .

Una vez depositadas y sedimentadas las células en el hemocitómetro, se procede a contar todas aquellas que estén dentro de los cuadrantes (I, II, III y IV), incluyendo las células sobre la línea de arriba y la línea de la derecha, sustrayéndolas posteriormente para seguir los cálculos pertinentes.

Las células vivas se tifieron de rojo, mientras que las muertas no captaron el colorante, por lo tanto sólo se contaron las rojas.

Para calcular el número de células se usó el siguiente criterio:

No. de células en los 5 cuadros X 2000 = No. total de células .

Para obtener el volumen que debe agregarse para tener la concentración de células recomendadas para el experimento, se utilizó la siguiente ecuación: $C_1 V_1 = C_2 V_2$

$$\frac{C_1 \cdot V_1 \times 2000}{C_2} = V_2$$

donde:

C_1 = No. de células en los 5 cuadros .

V_1 = ml del medio agregados para la suspensión inicial .

C_2 = No. de células deseadas / ml (400 000 cel./ml).

V_2 = ml que se deben agregar de medio para obtener la concentración deseada de células .

Para el presente estudio, se probaron concentraciones de 200 000 cel./ml, 300 000 cel./ml y 400 000 cel./ml, encontrándose que la suspensión óptima fue de 400 000 cel./ml de medio, tanto N-199 como MEM-Eagle .

4. Inoculación de las Micotoxinas en los Cultivos Celulares .

Una vez calculado y añadido el volumen de medio necesario para ajustar las células a 400 000/ml, se agitó perfectamente para

obtener una suspensión homogénea.

Se aspiró la suspensión celular con una micropipeta de 0.05 μ l, marca Flow, se depositó en cada uno de los pozos (cavidades) de la microplaca celular, marca Nunc-corning, de 96 pozos de fondo plano. Posteriormente, se agregaron 0.05 microlitros de medio y se agitó vigorosamente para obtener una distribución homogénea de las células.

Se agregaron las diferentes concentraciones de las micotoxinas, Zearalenona: 2ppm en 2 μ l, 4ppm en 4 μ l, 6ppm en 6 μ l, 8ppm en 8 μ l, 10ppm en 10 μ l, 20ppm en 20 μ l y 50ppm en 50 μ l; Aflatoxinas E₁, E₂, G₁ y G₂ : 2.5ppb en 1.2 μ l, 5ppb en 2.5 μ l, 10ppb en 5 μ l, 50ppb en 25 μ l y 100ppb en 50 μ l; Tricotecenos: DON y DAS , 1.2ppm en 1.2 μ l, 2ppm en 2 μ l, 4ppm en 4 μ l, 6ppm en 6 μ l, 8ppm en 8 μ l, 10ppm en 10 μ l, 20ppm en 20 μ l y 50ppm en 50 μ l; (figura. 5 (5) - con unas pipetas marca Eppendorf, de 2 a 10 μ l y de 10 a 100 μ l, - cambiando la punta de la pipeta para cada toxina, a las cavidades o pozos previamente identificados, corriendo por triplicado cada - concentración y con sus respectivos controles .

Se agitó nuevamente, se cubrió la placa con su tapa y con - parafilm, teniendo cuidado de sellar perfectamente los extremos pa - ra evitar la evaporación y contaminación, ya que en algunas ocasio - nes se ha observado que en esta zona hay intercambio gaseoso con el ambiente.

Se depositó la placa celular en un recipiente que contenía algodón húmedo en el fondo para evitar la deshidratación del conte - nido de la placa, se incubó a 37°C .

Se hicieron observaciones al microscopio a la 24hrs. para la zearalenona, 18hrs. para las aflatoxinas y tricotecenos y de 16 hrs. para los tricotecenos únicamente. Anotando la severidad del - daño causado al cultivo celular, debido a la toxicidad de las mic - toxinas agregadas, en comparación con la observación de una capa

confluente de células de los controles.

5. Criterio Para Establecer la Toxicidad .

a) Criterio para presentar resultados .

El criterio que se utilizó para interpretar y valorar la toxicidad causada por las micotoxinas a las células fue la observación directa del daño citológico causado al cultivo celular y estimando el grado de citotoxicidad de la siguiente manera:

100% de células vivas = - (sin daño) .

75% de células vivas = + (poco dañadas) .

50% de células vivas = ++ (más dañadas) .

25% de células vivas = +++ (dañadas) .

0% de células vivas = ++++ (muerte del cultivo celular) .

Se realizaron tablas para la representación de los resultados y gráficas para su interpretación .

b) Obtención de la dosis letal (LD_{50}) .

La LD_{50} representa la dosis más baja de micotoxina que es capaz de mostrar efecto citopático o muerte celular en el 50% del cultivo inoculado.

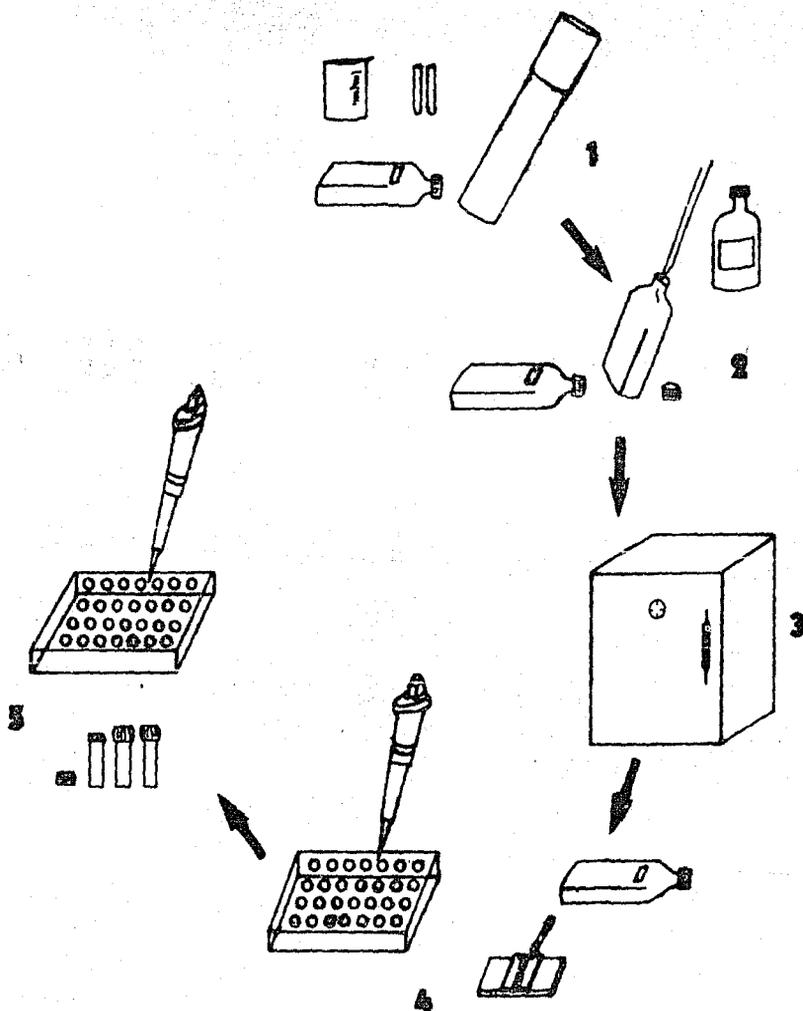


FIGURA 5: ESQUEMA DEL MÉTODO PARA CULTIVO CELULAR .

Figura 5 . Esquema del Método para Cultivo Celular .

1. Lavado y esterilización del material .
2. Descongelamiento de las células y preparación de las botellas Falcon o de leche, para los cultivos celulares.
3. Incubación de las células durante 2 o 3 días para la formación de la capa celular confluyente .
4. **Cuenta** celular y cultivo en microplaca celular .
5. Inoculación de la micotoxinas en los cultivos celulares .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizaron varios experimentos probando diferentes concentraciones en distintos volúmenes de micotoxinas, Zearalenona, - Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, Deoxinivalenol (DON) y Diacetoxiscirpenol (DAS), hasta lograr resultados satisfactorios, es decir, añadiendo volúmenes con concentraciones que no fueran ni muy bajas, de tal manera que no afectaran en lo absoluto al cultivo celular, ni - muy altas que lo destruyeran por completo.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo se presentan a continuación:

En la placa celular número uno, para células HeLa, en donde se aplicó la zearalenona, se partió de una concentración de - 1ppm/ μ l agregando diferentes volúmenes; 2ppm en 2 μ l, 4ppm en 4 μ l, - 6ppm en 6 μ l, 8ppm en 8 μ l, 10ppm en 10 μ l, 20ppm en 20 μ l y 50ppm en - 50 μ l y se esperó 24hrs. para ver su efecto; obteniéndose toxicidad del 25% para la concentración de 4ppm, la cual se fue acentuando - conforme fue aumentando el volumen, así con 6ppm se obtuvo el 50% de toxicidad, es decir, el 50% de células vivas y el 50% de células muertas, lo que equivale a la dosis letal (LD₅₀). Para 10ppm, - 20ppm y 50ppm la toxicidad fue del 100% (tabla 1).

En la segunda placa celular para células HeLa, fueron aplicadas las aflatoxinas, además del deoxinivalenol y el diacetoxiscirpenol a concentraciones, para las aflatoxinas en ppb y para los tricotecenos en ppm. Las concentraciones para las aflatoxinas fueron - 2.5ppb en 1.2 μ l, 5ppb en 2.5 μ l, 10ppb en 5 μ l, 50ppb en 25 μ l y 100 ppb en 50 μ l. Las concentraciones para los tricotecenos fueron 1.2 ppm en 1.2 μ l, 2.5ppm en 2.5 μ l, 5ppm en 5 μ l, 25ppm en 25 μ l y 50ppm en 50 μ l. Se esperó 18hrs. para ver su efecto.

Tabla 1. Efecto de Zearalenona en Células HeLa .
Primera Placa Celular .

Concentración de Zearalenona en DMSO .	Citotoxicidad causada por Zearalenona en células HeLa .
ppm / μ l	
2 2	-
4 4	+
6 6	++
8 8	+++
10 10	++++
20 20	++++
50 50	++++
control	-

- = 100% de células vivas .

+ = 75% de células vivas .

++ = 50% de células vivas .

+++ = 25% de células vivas .

++++ = 0% de células vivas .

DMSO = Dimetilsulfóxido 1%

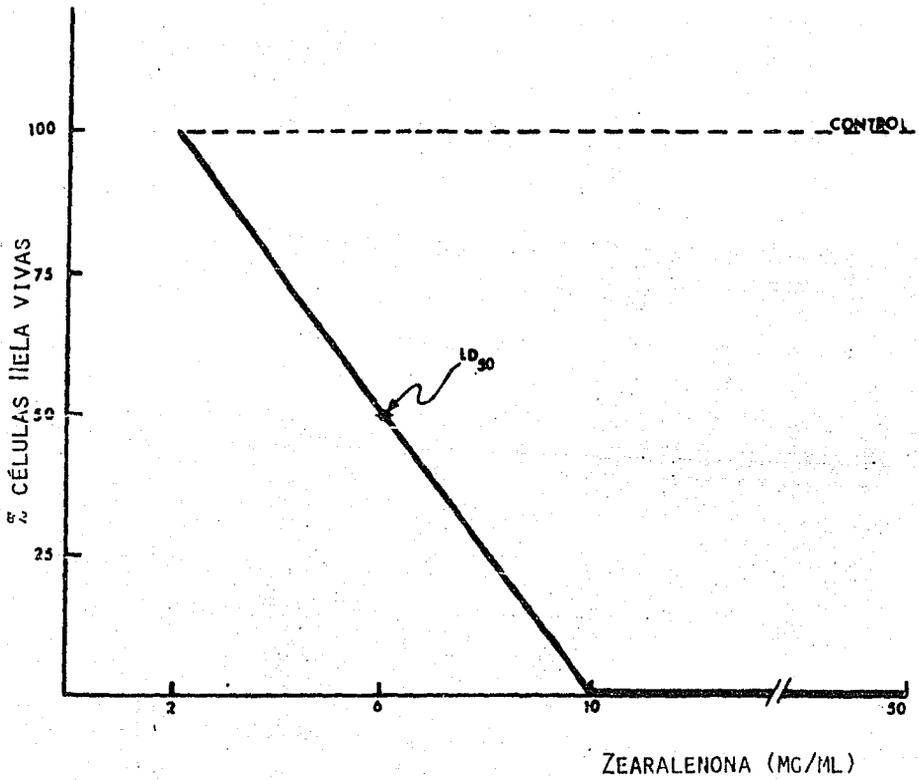


FIGURA 6: EFECTO DE LA ZEARALENONA EN CÉLULAS HELA .

se obtuvo para la aflatoxina B_1 , que la toxicidad fue aumentando en proporción directa a la concentración, así para 2.5ppb, la toxicidad fue del 25% al igual que para 5ppb, pero para 10ppb hubo el 50% de toxicidad, es decir, aquí se obtuvo la dosis letal para B_1 ; para la siguiente concentración de 50ppb la toxicidad fue del 75% y finalmente, para la concentración de 100ppb la toxicidad fue del 100%. El efecto tóxico de B_2 fue menor, para las tres primeras concentraciones no hubo toxicidad, sino hasta 50ppb hubo el 100% de toxicidad al igual que para 100ppb. El comportamiento de G_1 fue igual. El de G_2 fue todavía menor, ya que para las tres primeras concentraciones no hubo toxicidad, para 50ppb hubo el 50% de toxicidad, es decir, el valor para la dosis letal y para 100ppb, la toxicidad fue del 100%.

Con respecto a los tricotecenos, deoxinivalenol y diacetoxiscirpenol, los resultados fueron drásticos, dando el 100% de toxicidad para todas las concentraciones (tabla 2).

En la tercera placa celular para células HeLa, se aplicaron únicamente el deoxinivalenol y el diacetoxiscirpenol para hacer una mejor comparación de sus efectos. Las concentraciones usadas fueron 1.2ppm en 1.2 μ l, 2ppm en 2 μ l, 4ppm en 4 μ l, 6ppm en 6 μ l, 8ppm en 8 μ l, 10ppm en 10 μ l, 20ppm en 20 μ l, 25ppm en 25 μ l, 35ppm en 35 μ l, y 50ppm en 50 μ l. Se esperó 16hrs. para ver sus efectos. Obteniéndose que el deoxinivalenol no causó toxicidad en las dos primeras concentraciones, pero a partir de 4ppm la toxicidad fue aumentando conforme aumentó la concentración, para 4ppm y 6ppm la toxicidad fue del 25%, para 8ppm y 10ppm fue del 50%, equivalente a la dosis letal para 20ppm y 35ppm fue del 75% y para la concentración de 50ppm la toxicidad fue del 100% (tabla 3).

Tabla 2 . Efecto de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y de Tricotecenos (DON y DAS) en células HeLa .
Segunda Placa Celular .

Micotoxina	Concentración de aflatoxinas (ppb) y de tricotecenos (ppm) en DMSO .							
	2.5ppb/1.2 μ l	5/2.5	10/5	50/25	100/50			
B ₁	+	+	++	+++	++++			
B ₂	-	-	-	++++	++++			
G ₁	-	-	-	++++	++++			
G ₂	-	-	-	++	++++			
	1.2ppm/1.2 μ l	2/2	4/4	6/6	8/8	10/10	20/20	50/50
DON	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
DAS	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
control	-	-	-	-	-	-	-	-

- = 100% de células vivas.

+ = 75% de células vivas.

++ = 50% de células vivas.

+++ = 25% de células vivas.

++++ = 0% de células vivas.

D = Deoxinivalenol

S = Diacetoxiscirpenol

C = Dimetilsulfoóxido 1%

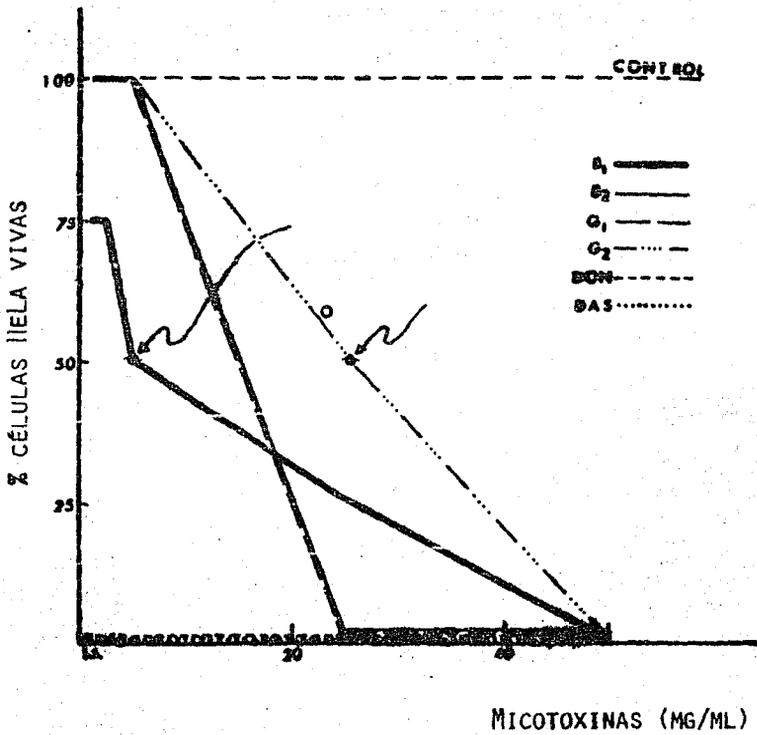


FIGURA 7: EFECTO DE LAS AFLATOXINAS Y TRICOTECENOS EN CÉLULAS HELA.

Tabla 3. Efecto de tricotecenos (DON y DAS) en células HeLa .
Tercera Placa Celular .

Tricoteceno	Concentración de los tricotecenos (ppm/ μ l) en DMSO .									
	1.2/1.2	2/2	4/4	6/6	8/8	10/10	20/20	35/35	50/50	
DON	-	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	
DAS	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	

- = 100% de células vivas .

+ = 75% de células vivas .

++ = 50% de células vivas .

+++ = 25% de células vivas .

++++ = 0% de células vivas .

DON = Deoxinivalenol

DAS = Diacetoxiscirpenol

DMSO = Dimetilsulfóxido 1%

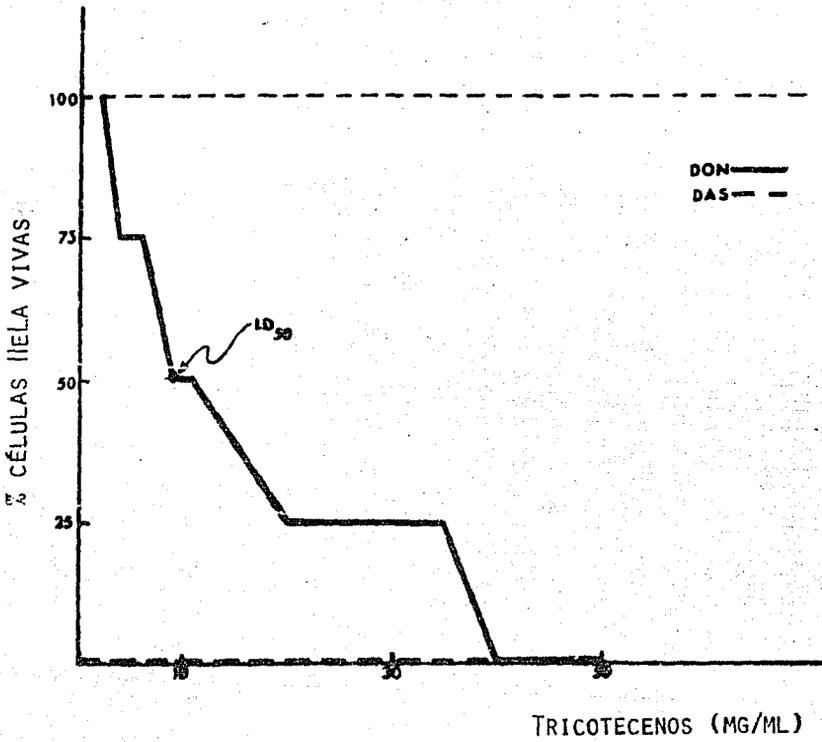


FIGURA 8: EFECTO DEL DEOXINIVALENOL (DON) Y DEL DIACETOXISCIRPENOL (DAS) EN CÉLULAS HELA.

La gráfica 1, correspondiente a la primera placa celular para HeLa, muestra claramente la toxicidad de la zearalenona a diferentes concentraciones. Conforme va aumentando la concentración de esta micotoxina, disminuye el porcentaje de células vivas (figura 6).

La gráfica 2, corresponde a la segunda placa celular para HeLa, en donde se pueden apreciar los diferentes efectos tóxicos de las aflatoxinas, la B₁ causó la mayor toxicidad. Las aflatoxinas B₂ y G₁ se comportaron igual y la G₂ fue la que causó menor toxicidad de todas. El deoxinivalenol y el diacetoxicirpenol causaron el 100% de toxicidad en todas las concentraciones (figura 7).

La gráfica 3, corresponde a la tercera placa celular para HeLa y representa la toxicidad del deoxinivalenol y del diacetoxicirpenol, notándose por una parte, el comportamiento menos tóxico del deoxinivalenol y por otra parte el efecto totalmente tóxico del diacetoxicirpenol(figura 8).

Para trabajar con las células BGM, se siguió el mismo procedimiento que en las células HeLa, haciendo el mismo número de placas celulares y aplicando iguales concentraciones de las diferentes micotoxinas, para que pudieran, posteriormente, ser comparables.

Los resultados que se obtuvieron en la primera placa celular para BGM, en donde se aplicó la zearalenona, fueron para la concentración de 2ppm el 25% de toxicidad, incrementándose progresivamente conforme fue aumentando la concentración de la micotoxina, de tal forma que para la concentración de 4ppm se obtuvo el 50% de toxicidad y para la concentración de 5ppm en adelante, el 100% de toxicidad (tabla 4).

En la segunda placa celular para BGM, en donde se aplicaron todas las aflatoxinas y los tricotecenos, se obtuvo que la aflatoxi

Tabla 4. Efecto de Zearalenona en Células BGM.
Primera Placa Celular .

Concentración de Zearalenona en DMSO .	Citotoxicidad causada por Zearalenona en células BGM .
ppm / μ l	
2 2	+
4 4	++
6 6	+++
8 8	++++
10 10	++++
20 20	++++
50 50	++++
control	/

- = 100% de células vivas .

+ = 75% de células vivas .

++ = 50% de células vivas .

+++ = 25% de células vivas .

++++ = 0% de células vivas .

DMSO = Dimetilsulfoxido 1%

BGM = Buffalo Green Monkey

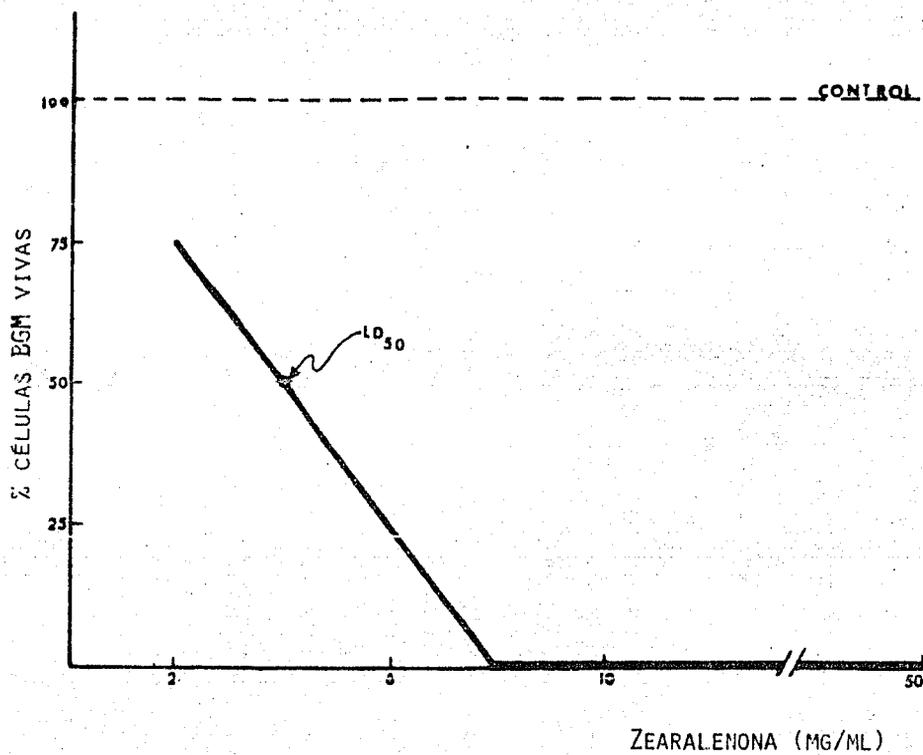


FIGURA 9: EFECTO DE LA ZEARALENONA EN CÉLULAS BGM.

na B_1 causó toxicidad del 50% (dosis letal) desde una concentración de 2.5ppb al igual que para la concentración de 5ppb; para 10ppb causó el 75% de toxicidad y para 50ppb y 100ppb causó el 100% de toxicidad. Las aflatoxinas B_2 y G_1 causaron la misma toxicidad exhibiendo el 25% de la misma en la concentración de 5ppb, el 50% de toxicidad o dosis letal en 10ppb y el 100% de toxicidad en 50ppb y 100ppb. La aflatoxina G_2 fue la que afectó menos las células, causando hasta la concentración de 10ppb el 50% de toxicidad y obteniéndose aquí la dosis letal; para 50ppb y 100ppb la toxicidad fue del 100%. La toxicidad ocasionada por el deoxinivalenol y el diacetoxiscirpenol fue del 100% para todas las concentraciones (tabla 5).

En la tercera placa celular para EGM, en donde se aplicaron únicamente el deoxinivalenol y el diacetoxiscirpenol, los resultados para el primer tricoteceno fueron, para 2ppm y 4ppm el 25% de toxicidad y para 35ppm y 50ppm el 100% de toxicidad, mientras que para el diacetoxiscirpenol en todas las concentraciones se obtuvo el 100% de toxicidad (tabla 6).

En la gráfica 4, correspondiente a la primera placa celular para células EGM, se nota un decremento rápido en el porcentaje de las células vivas, conforme aumentan las concentraciones de zearalenona hasta llegar a un máximo de toxicidad y muerte celular (figura 9).

En la gráfica 5, correspondiente a la segunda placa celular para EGM, están representadas las diferentes micotoxinas a excepción de la zearalenona, apreciándose que la aflatoxina B_1 es la que causó mayor daño celular. Las aflatoxinas B_2 y G_1 causaron similar toxicidad y que la G_2 causó menos toxicidad que todas.

Se observa también, que los tricotecenos causaron para to

Tabla 5 . Efecto de Aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂ y de tricotecenos (DON y DAS) en células BGM .
Segunda Placa Celular .

Micotoxina Concentración de aflatoxinas (ppb) y de tricotecenos (ppm) en DMSO .

	2.5ppb/1.2	1	5/2.5	10/5	50/25	100/50
B ₁	+		+	++	++++	++++
B ₂	-		-	-	++++	++++
G ₁	-		-	-	++++	++++
G ₂	-		-	-	++	++++

	1.2ppm/1.2	1	2/2	4/4	6/6	8/8	10/10	20/20	50/50
DON	++++		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
DAS	++++		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
control	-		-	-	-	-	-	-	-

- = 100% de células vivas.
- + = 75% de células vivas.
- ++ = 50% de células vivas.
- +++ = 25% de células vivas.
- ++++ = 0% de células vivas.

DON = Deoxinivalenol
 DAS = Diacetoxiscirpenol
 DMSO = Dimetilsulfóxido 1%

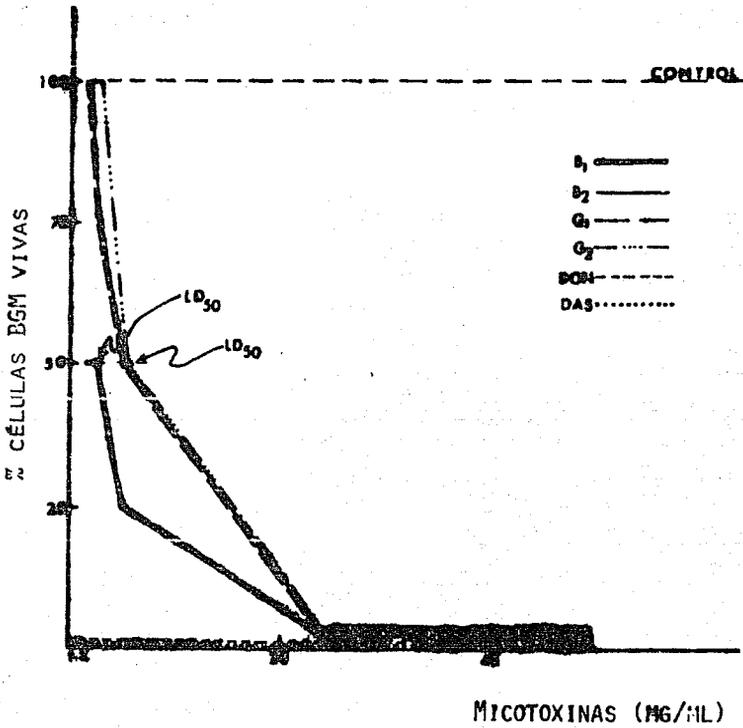


FIGURA 10: EFECTO DE LAS AFLATOXINAS Y TRICOTECENOS EN CÉLULAS BGM.

Tabla 6. Efecto de Tricotecenos (DON y DAS) en células BGM .
Tercera Placa Celular.

Tricoteceno	Concentración de los tricotecenos (ppm/ l) en DMSO .									
	1.2/1.2	2/2	4/4	6/6	8/8	10/10	20/20	35/35	50/50	
DON	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++	
DAS	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	

- = 100% de células vivas .

+ = 75% de células vivas .

++ = 50% de células vivas .

+++ = 25% de células vivas .

++++ = 0% de células vivas .

DMSO = Dimetilsulfóxido 1%

BGM = Buffalo Green Monkey

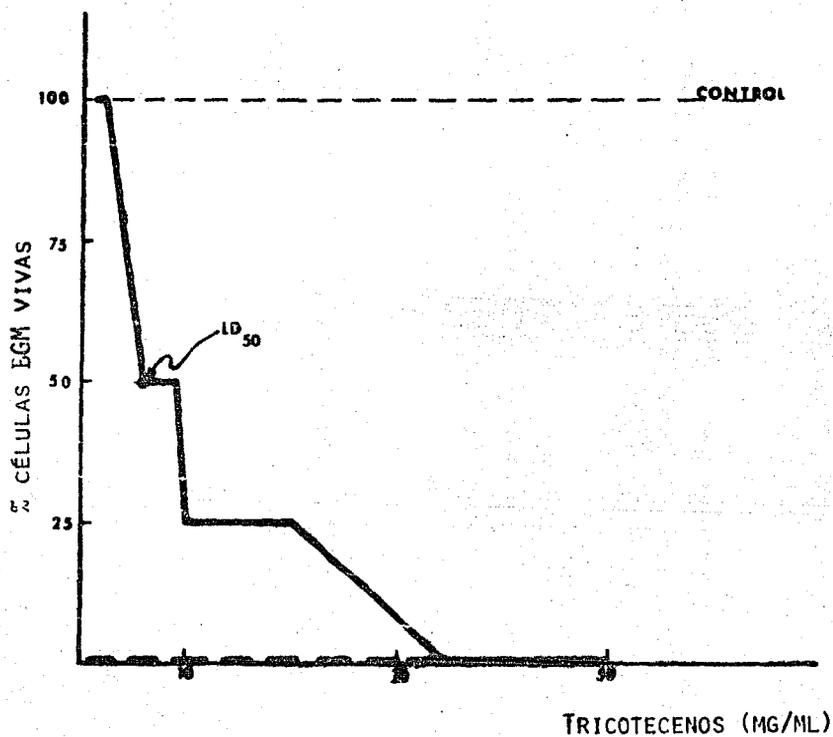


FIGURA 11: EFECTO DEL DEOXINIVALENOL (DON) Y DEL DIACE - TOXISCIRPENOL (DAS) EN CÉLULAS EGM.

das las concentraciones, el 100% de toxicidad y muerte celular -
(figura 10).

La gráfica 6, correspondiente a la tercera placa celular para EGM, muestra las diferencias en toxicidad de los tricotecenos (DON y DAS), notándose enseguida que el deoxinivalenol es menos tóxico (figura 11).

Los resultados obtenidos en este trabajo, indican que la zearalenona fue la micotoxina que causó menos citotoxicidad a los cultivos celulares, ya que aunque los valores de LD_{50} fueron ligeramente más altos ($6\mu\text{g/ml}$ en HeLa ; $4\mu\text{g/ml}$ en BGM) que los valores obtenidos para el deoxinivalenol ($8\mu\text{g/ml}$ en HeLa ; $6\mu\text{g/ml}$ en EGM), se debe tomar en cuenta que la zearalenona tuvo un tiempo mucho mayor de exposición (zearalenona 24hrs. ; deoxinivalenol - 16hrs.).

Se han encontrado en el D.F. tortillas de maíz contaminadas con zearalenona, en concentraciones mucho mayores (300 a 1000 ppm) que los valores dañinos para las células, o sea LD_{50} de esta investigación; de hecho al pasar por el aparato digestivo se degrada la zearalenona, pero los niveles encontrados en 214Kg de tortillas de la delegación Cuauhtémoc fueron de 6Kg con zearalenona en 5 muestreos, equivalente a 2.8% de tortillas contaminadas. Como en la ciudad de México se consumen alrededor de 2200 toneladas diarias de tortillas, equivale a 61.6 toneladas diarias consumidas con zearalenona (Carvajal, M. 1988. Comunicación personal).

Las diferencias entre la citotoxicidad de un tricoteceno y otro son muy marcadas, mientras que para el deoxinivalenol se lograron obtener varios porcentajes de citotoxicidad y valores de LD_{50} ; para el diacetoxiscirpenol, esto no fue posible para ninguna de las concentraciones en ambos cultivos celulares, puesto que sien

pre causó el 100% de muerte celular, lo que indica una mayor - citotoxicidad.

En los experimentos donde los tricotecenos son aplicados en las mismas placas celulares con las aflatoxinas, se obtiene el 100% de toxicidad para todas las concentraciones, sin encontrar diferencias en la toxicidad de las tricotecenos, pero en las placas celulares en donde únicamente se aplicaron los tricotecenos, sí se encontraron diferencias, esto puede ser explicado porque en el segundo caso, además de aplicar concentraciones - más pequeñas, el tiempo de exposición fue menor, lo que indicaría que los tricotecenos actúan en menor tiempo.

Son preocupantes los resultados obtenidos con DAS, puesto que en una investigación realizada por Rodríguez (1988), comunicación personal, se encontró que de 100 muestras de pastas de harina de trigo para sopas, un 6% estuvo contaminado con DAS y como sabemos, los tricotecenos son muy resistentes al calor, - llegando a soportar 200°C sin inactivarse. El DAS puede ser un peligro para la salud humana.

De las aflatoxinas, consideradas también altamente tóxicas razón por la cual se aplicaron a ppb, se obtuvieron los valores más altos de LD₅₀ (5µg/ml para B₁ en HeLa; 1.2µg/ml para B₁ en BGM; 25µg/ml para G₂ en HeLa; 5µg/ml para G₁, G₂ y B₂ en BGM). La aflatoxina B₁ fue la más tóxica en todos los casos, lo que corresponde a lo antes reportado en la bibliografía.

Con respecto a las aflatoxinas se encontraron también - en tortillas de la Ciudad de México, en 214Kg: 2.8% de B₁, un - 1.8% de B₂ y 1.4% de G₂ que serían equivalentes a 61.6 toneladas de tortillas con aflatoxina B₁, 39.6 ton con aflatoxina B₂ y 30.8 ton con aflatoxina G₂ consumidas diariamente (Carvajal, M. 1988. Comunicación personal).

Además, las aflatoxinas están contaminando con frecuencia los cacahuates y un 1% de pastas para sopa, y son conocidos cancerígenos y teratógenos.

No es posible hacer una comparación directa entre todas y cada una de las micotoxinas, debido a que actúan a diferente tiempo y a diferentes concentraciones, así, la zearalenona y los tricotecenos fueron aplicados a ppm, pero el tiempo de acción es más corto para los tricotecenos; las aflatoxinas fueron aplicadas a ppb, pues su efecto tóxico se lleva a cabo con concentraciones menores y a un tiempo de exposición menor que la zearalenona, pero un poco mayor que el de los tricotecenos.

Los valores de LD₅₀ obtenidos para HeLa son más altos que los obtenidos para BGM, lo que indica una mayor susceptibilidad de parte de las células BGM a las micotoxinas que las células HeLa, - esto puede ser explicado porque las células BGM provienen de un órgano sano (riñón), mientras que las células HeLa provienen de un carcinoma, lo que indica que son células ya transformadas.

Finalmente, los valores de LD₅₀ obtenidos en este estudio para células HeLa y BGM, son más altos que los valores de toxicidad reportados para fibroblastos humanos, por Hamed et al., 1984 .

Existen muchos géneros al igual que especies de hongos - que producen toxinas, las cuales se hallan extensamente en nuestros alimentos y en los i.rrajes para animales. Por ello, su riesgo potencial es significativo, además de ejercer efectos nocivos en la salud humana y animal, siendo las condiciones clínicas que se han encontrado en ambos casos, bastante complejas y la elaboración de un diagnóstico adecuado sobre el efecto que producen, especialmente difícil.

Por otro lado, además del beneficio de los antibióticos, recientemente se ha informado del efecto anticancerígeno de los tricotecenos, teniéndose algunas esperanzas de encontrarles propiedades medicinales (Rodricks, et al., 1977) .

Debido a estas razones y muchas otras, las micotoxinas son ahora reconocidas como tóxicos comunes en ciertas enfermedades de humanos y animales, constituyendo el objeto más importante de la micotoxicología, por lo que se hace evidente la urgencia de estudios en planteamientos ecológicos acerca de la toxicidad de los hongos productores de micotoxinas, estandarización internacional de la taxonomía de los hongos productores de micotoxinas, protección de los productos alimenticios de la contaminación por hongos productores de micotoxinas, establecimiento de procedimientos de desintoxicación por la acción de micotoxinas, desarrollo de métodos de análisis sensibles y específicos, mayor evaluación de las micotoxinas a través de investigaciones permanentes sobre micotoxicología, estudios sobre micotoxicología, estudios sobre la combinación de los efectos tóxicos de las diferentes micotoxinas, conocimiento sobre el metabolismo y el destino que tienen las micotoxinas en animales, la posible contaminación secundaria en humanos por ingestión de productos diarios contaminados por micotoxinas, etc. que ayuden a la detección oportuna de estos agentes contaminantes y al ulterior desarrollo de intoxicaciones graves y agudas, así como a la determinación y resolución de la magnitud de este problema.

Es importante también, recalcar la necesidad de realizar estudios sobre la acción de la micotoxinas en el ser humano, puesto que existen pocos reportes sobre el tema, esperando que este trabajo contribuya a dicho propósito.

CONCLUSIONES .

1. Las dosis letales de las micotoxinas en el cultivo de células

HeLa fueron:

- a) 6ppm para zearalenona .
- b) 10ppb para aflatoxina B_1 .
- c) 50ppb para aflatoxina G_2 .
- d) No se obtuvo para aflatoxina B_2 y G_1 .
- e) 8ppm para deoxinivalenol .
- f) Menos de 1.2 ppm para diacetoxiscirpenol.

2. Las dosis letales de las micotoxinas en el cultivo celular -

EGM fueron:

- a) 4ppm para zearalenona . .
- b) 25ppb para aflatoxina B_1 .
- c) 10ppb para B_2 , G_1 y G_2 .
- d) 6ppm para deoxinivalenol .
- e) Menos de 1.2ppm para diacetoxiscirpenol.

3. Las dosis mínimas de acción de las micotoxinas en el cultivo - celular HeLa fueron:

- a) 4ppm para zearalenona .
- b) 2.5ppb para aflatoxina B_1 .
- c) 50ppb para aflatoxinas B_2 , G_1 y G_2 .
- d) 4ppm para deoxinivalenol .
- e) Menos de 1.2ppm para diacetoxiscirpenol.

4. Las dosis mínimas de acción de las micotoxinas en el cultivo - celular EGM fueron:

- a) 2ppm para zearalenona .
- b) 2.5ppb para aflatoxina B_1 .
- c) 5ppb para aflatoxinas B_2 , G_1 .
- d) 10ppb para aflatoxina G_2 .

e) 2ppm para deoxinivalenol .

f) Menos de 1.2ppm para diacetoxiscirpenol.

5. Las células sanas de riñón de mono verde son más susceptibles a la acción de las micotoxinas que las HeLa, de carcinoma cervicouterino.

6. La aflatoxina B₁ fue la que presentó el efecto más severo en ambos cultivos celulares, - siguiéndole en orden, las aflatoxinas B₂, G₁ y G₂ seguidas de diacetoxiscirpenol y deoxinivalenol y por último zearalenona .

L I T E R A T U R A C I T A D A .

ASPLIN, F.D. y CARNAGHAN, R.B.A. 1961. The toxicity of certain groundnut meals for poultry with especial reference to their - effect on duckling and chicken. Vet. Res. 73(46): 1215-1219.

BLOOD, D.C. y HENDERSON, J.A. 1969. Medicina Veterinaria. Ed. - Interamericana, Barcelona, España. 760pp.

BOLLIGER, G. y TAMM, C. 1972. Vierneve metabolite von Giberella zese; 5' formil-zearalenol, 7' dehidrozearalenon, 8' hydroxy, 8' epihidroxyzearalenone. Helv. Chim. Acta 55: 3030-3048.

BROWN, H.M. 1965. Biochemical changes in the livers of domestic birds poisoned with aflatoxin. Afric. Med. J., 39: 778-786.

BUCK, B.W. y OSWEILER, D.G. 1976. Clinical and diagnostic veterinary toxicology. Second Edition. Kendal/Hunt Publishing Company, Iowa. 261-267.

BULLOUGH, W.S. y LAURENCE, B. 1970. Chalone control of mitotic activity in sebaceous glands. *Cell Tissue Kinet*, 3: 291-300.

BUSCH, H. 1962. *Biochemistry of the cancer cell*. Academic Press. New York, U.S.A. 843pp.

CAMERON, I.L. y THRASHER, J.D. 1971. *Cellular and molecular renewal in the mammalian body*. Academic Press. New York, U.S.A. 941pp.

CHANG, K., KURTZ, H. y MIROCHA, C.J. 1979. Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *Am. J. Vet. Res.*, 40: 1260-1267.

CHRISTENSEN, C.M. y NELSON, G.H. 1976. Mycotoxins and mycotoxicoses Part one. *Mod. Vet. Pract.*, 57: 367-371.

CHRISTENSEN, C.M. y KAUFMANN, H.H. 1969. Contaminación por hongos en granos almacenados. Ed. Pax-México. 199pp.

CLIFFORD, J.I. y REES, K.R. 1966. Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. *Nature*, 209: 312-313.

DANIEL, C.W. y YOUNG, L.J.T. 1971. Influence of cell division on ageing process; life span of mouse mammary epithelium during serial propagation in vivo. *Exp. Cell Res.*, 65: 27-32.

EAGLE, H. 1960. The sustained growth of human and animal cells in a protein-free environment. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 46: 427-432.

EPPLEY, M.R. 1975. Methods for detection of trichothecenes. *J. of the AOAC*, 5(5): 906-908.

EPPLEY, M.R. 1978. Trichothecenes and their analysis. J. Am. Oil Chem. Soc., 56: 824-829.

FORGACS, J., KOCH, H. y CARLL, W.I. 1955. Further mycotoxic studies on poultry hemorrhagic disease. Poultry Science, 34: 1194.

FORGACS, J., KOCH, H., CARLL, W.T. y WRITE-STEVENS, R.H. - 1962. Relationship of toxic fungi to moldy-free toxicoses in poultry. Avian Diseases, 6: 363-380.

FORGACS, J., KOCH, H., CARLL, W.T. y WRITE-STEVENS, R.H. 1968. Additional studies on the relationship of mycotoxicoses to the poultry hemorrhagic syndrome. Am. J. Vet. Res., 19: 744-752.

GEY, G., COFFMAN, W.D. y KUBICEK, M.T. 1951. Tissue culture studies of proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res., 12: 264-265.

GILLESPIE, A.M. y SCHENK, G.M. 1977. Fluorescence and phosphorescence of ochratoxins, sterigmatocystin, patulin and zearalenone: Quantitation of ochratoxins. *Anal. Lett.*: 10(2): 161-172.

GOLDBLATT, L.A. 1969. Aflatoxin. Scientific background, control and implications. Ed. Board, 1a. Ed. New York and London. 425pp.

HAGLER, W.M., MIROCHA, C.J., PATHRE, S.V. y BOHRENS, J.C. 1979. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by Fusarium roseum "Gibbosum". *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 849-853.

HAMED, K., THOMAS, S. y MIROCHA, C. 1984. Sensitivity of cultured human and mouse fibroblast to trichothecenes. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 67(3): 607-610.

HARLAND, E.C. y CARDEILHAC, P.T. 1975. Excretion of C¹⁴ labeled aflatoxin B₁ viable, urine and intestinal contents of the chicken. *Am. J. Res.*, 36: 904-912.

HAYFLICK, L. 1975. Cell biology of ageing. *Bioscience*, 25: 629-637.

KATSUTA, H. y TAKAOKA, T. 1973. Cultivation of cell in protein free and lipid free syntetic media in methods in cell biology. Vol. 6. Prescott, Ed. Academic Press, New York, U.S.A. 1-42.

KING, A.M.Q., NICHOLSON, B.H. 1967. Effect of aflatoxin B₁ on a deoxiribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase. *Biochem. J.* 104: 69-70.

KROGH, P. HALD, B., ENGLUD, P., RUTQUIST, L. y SWAHN, O. 1974. Contamination of swedish cereals with ochratoxin A. *Acta Path. Microbiol., Scand. Section B.*, 82: 301-302.

LINDENFELSKER, L.A., LILLEHOJ, B.E. y BURMEISTER, R.H. 1974. Aflatoxin and trichotecene toxins: skin tumor induction and synergistic acute toxicity in white mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 113-116.

MABEE, M.C. y CHIPLEY, J.R. 1973. Tissue distribution and metabolism of aflatoxin B₁ - C¹⁴ in broiler chickens. *Appl. Microbiol.*, 25: 763-769.

MC MINN, R.M.H., 1969. Tissue repair. Academic Press, New York, U.S.A. 685pp.

MEYER, C.F. 1953. Endemic panmyelotoxicosis in the russian - grain belt. Part one: The clinical aspects of alimentary toxic aleukia (ATA); a comprehensive review. Mil. Serg., 113: 173-189.

MIROCHA, G.J. y CHRISTENSEN, C.M. 1983. Storage of cereal grains and their products. Cap. 8: Mycotoxins. Ed. Academic Press, - New York, U.S.A. 241-280.

MIROCHA, G.J. y PATHRE, S. 1973. Natural ocurrence of Fusarium toxins in foodstuff. Appl. Microbiol., 26: 719.

MIROCHA, G.J., PATHRE, S.V. y CHRISTENSEN, C.M. 1977. Zearalenone. Mycotoxins in human and animal health. Ed. Pathotox Publishers, Inc. Park Forest South, Illinois. 345-364.

NEWBERNE, M.F. 1973. Chronic aflatoxicosis. J.Am. Vet. Med. Ass. 163: 1262-1267.

OHTA, M., y UENO, Y. 1976 . Studies on the metabolism of trichothecene mycotoxin. I. Enzymatic deacetylation of T-2 toxin. Proc. Jap. Assoc. Mycotoxicol., 2: 34-35.

PATHRE, S.Y., FENTON, S.W. y MIROCHA, C.J. 1980. 3'-hidroxi-zearalenones, two new metabolites produced by Fusarium roseum. Agric. Food Chem., 28: 421-424.

PAUL, J. 1970. Cell and tissue culture. 4a. Ed. Williams y - Wilkins, Baltimore, U.S.A. 728pp.

PHILLIPS, H.J. 1972. Dissociation of single cells from lung or kidney tissue with elastase "in vitro". 8: 101-105.

PIER, A.C. 1973. An overview of the mycotoxicoses of domestic animals. J. Am. Vet. Med. Assoc., 163: 1259-1261.

PIPPI, S.T.C., ANTILLON, R.A. y ROSILES, M.R. 1980. Aflatoxicosis en aves domésticas. Veterinaria, México. 11: 13-22.

FOCK, T.T. 1972. The mammalian cells as microorganisms. Holden-Day Inc., San Francisco., U.S.A. 954pp.

ROBISON, T.S., FENTON, S.W. y MIROCHA, C.J. 1979. Isolation of 4'5' dihydroxyzearalenone a zearalenone related metabolite of Fusarium roseum "Gibbosum". Abstract of Papers, Agric. Food Div., Am. Chem. Soc., Paper 80. 178th Nat. Meeting.

RODRICKS, V.J., HESSELTINE, W.C. y MEHLMA, A.M. 1977. Mycotoxins in human and health. Ed. Pathotox Publishers, Inc. - Park Forest South, Illinois. 807pp.

ROSILES, R. y LOPEZ, R. 1977. Síndrome estrogénico de origen alimenticio en cerdos. Veterinaria, México. 8: 123-126.

SARGEANT, K., O'KELLY, J., CARNAGHAN, R.B.A. y ALLCROFF, R. 1961 a. The assay of a toxic principle in certain groundnut meal. Vet. Rec. 73: 1219-1223.

SATO, N., UENO, Y. y ENOMOTO, M. 1975. Toxicological approaches to the toxic metabolites of Fusarium. VIII. Acute and - Subacute toxicities of T-2 toxin in cats. Japan. J. Pharmacol., 25: 263-270.

SAWNEY, D.S., VADEHRA, D.V. y BAKER, R.C. 1973. The metabolism of C¹⁴ - aflatoxins in laying hens. Poul. Sci., 52: 1302-1309.

SHOTWELL, O.L., GOULDEN, M.L., JEPSON, A.M., KWOLEK, W.F. and HESSELTINE, C.W. 1969. Aflatoxin occurrence in some white corn under loan. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 670.

SHREEVE, B.J., PATTERSON, D.S.F. y ROBERTS, B.A. 1975. Investigations of suspected cases of mycotoxicoses in farm animals in Britain. Vet. Res., 97: 275.

SMITH, R.H. 1963. The influence of toxins of Aspergillus flavus on the incorporation of C¹⁴ leucine into proteins. Biochem. J., 88: 50-51.

STEELE, J.A., MIRCCHA, C.J. y FATHRE, S.V. 1976. Metabolism of zearalenone by Fusarium roseum. J. Agric. Food Chem., 24: 89.

STOLOFF, L., NESSHEIM, S., YIN, L., RODRICKS, J.V., STACK, H. y CAMPBELL, A.D. 1971. Multimycotoxin detection method - for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Assoc. Off. Ana. Chem. 54: 91-97.

STOLOFF, L., y DAIRYMPLE, B. 1976. Aflatoxin and zearalenone occurrence in dry-milled corn products. J. of the AOAC 60(3): 570-582.

TODARO, R.C. y BADLETT, P.J. 1966. Large scale cultivation of mammalian cells. Adv. Appl. Microbiol. 13: 91-119.

UENO, Y., UENO, I., IITOI, Y., TSUNODA, H., ENOMOTO, M. y OHTSUBO, K. 1971. Toxicological approaches to the metabolites of Fusaria III. Acute toxicity of fusarenon-X. Japan. J. Exp. Med., 41: 521-539.

Apéndice 1 . Establecimiento de Cultivos Primarios .

Preparación de cultivos de células de riñón de mamífero .

Materiales.

Riñón de mono, hámster, conejo, feto bovino, etc.; solución salina equilibrada de Hansk (SSE), tripsina (1:250) al 0.25%, medio de cultivo con hidrolizado de lactalbúmina (HLA), cajas de Petri de 60 x 15 y 100 x 15 mm, tijeras, bisturíes, pinzas, pipetas, matraz de Erlenmeyer con acanaladuras verticales en sus paredes, agitador, magnético, tubos de centrifuga, recipientes para las células y material diverso.

Técnica.

1. Extirpar asépticamente los riñones del animal recién anestesiado, sacrificado y sangrado. Son preferibles de feto bovino de 4 a 6 meses. El cordón umbilical se seccionará para el desangrado del feto antes de que éste sea separado del útero.

Para su traslado al laboratorio, los riñones deben colocarse intactos en un recipiente estéril con una cantidad de SSE con antibiótico suficiente para cubrirlos.

2. Descapsularlos con ayuda de tijeras y pinzas, desechando el tejido conectivo y los coágulos sanguíneos.

El riñón bovino está dividido superficialmente de lóbulos, mientras que otros riñones no.

3. En el caso de riñón unilobulado, hay que cortarlo longitudinalmente en dos mitades con ayuda de un bisturí, sujetándolo convenientemente. Con la superficie de corte hacia arriba, sujetar el riñón con pinzas y separar con un bisturí la zona cortical de la medular. Poner la corteza renal en una caja de Petri con SSE fría.

En el caso del riñón bovino, sujetar el riñón con ayuda -

de pinzas y mediante tijeras separar cada uno de los lóbulos del mismo. Al obtener la corteza de cada lóbulo, se coloca en una caja de Petri con la misma solución.

4. Lavar los trozos de corteza renal aplicando a las cajas de Petri un ligero movimiento de balanceo. Manteniendo la placa levemente inclinada, eliminar la solución de lavado con ayuda de una pipeta, siendo preferible usar una Pasteur con pera de goma para retirar las últimas gotas.

5. Trozar la corteza en cubos de 1 a 2 mm, valiéndose de bisturís provistos de hojas Pard-Parker del número 15. Tomar dos de ellos, uno en cada mano, formando ángulo de 45°; con las hojas paralelas y con los filos uno frente a otro. Cortar la corteza en cortes finos mediante movimientos adecuados. Si se desea, esta operación puede realizarse con unas tijeras.

6. Quitar los coágulos sanguíneos y el tejido fibroso con ayuda de unas pinzas. Añadir SSE y dar movimientos de rotación a la placa para lavar los fragmentos de corteza renal. Eliminar la SSE con ayuda de una pipeta. Repetir el lavado varias veces, utilizando cada vez una solución, hasta que ésta permanezca clara.

A continuación del último lavado y una vez retirado el SSE, recoger los fragmentos de corteza renal con una cucharilla perforada o con pinzas y colocarlos en un matraz Erlenmeyer con acanaladuras verticales en su pared y provisto de agitador recubierto de teflón y con tripsina al 0.25% en SSE, ajustada a pH 8.0-8.4. El volumen de solución de tripsina a utilizar dependerá de la cantidad del tejido a tripsinizar. En general, para cada ración son necesarias 200 a 300ml de solución de tripsina. La operación se lleva a cabo en un frasco de 500ml.

8. Colocar el Erlenmeyer en el agitador magnético. Con ayuda de una pinza-abrazadora fijada a altura conveniente en la varilla metálica vertical inserta en la plataforma del agitador, rodear el cuello del Erlenmeyer de tal forma que su fondo quede a algo más de

lca de la parte más alta del agitador magnético. De esta manera, las células no sufren sobrecalentamiento durante la tripsinización.

Ajustar el reostato de rotación, hasta conseguir que la varilla gire con la suficiente rapidez para una mezcla adecuada, evitando la formación de espuma. Mantener en agitación los fragmentos de corteza renal a temperatura ambiente durante una hora o a 27°C durante 20 o 30min.

El Erlenmeyer conteniendo las piezas de corteza renal en solución de tripsina puede conservarse a 4°C durante una noche antes de proceder a la agitación. En este caso adicionar la cantidad de tripsina suficiente para cubrir los fragmentos así como la varilla agitadora. A la mañana siguiente, retirar la solución de tripsina. Añadir nueva solución de tripsina tibia y llevar a cabo la tripsinización siguiendo los puntos 7 y 8 de la técnica que venimos desarrollando.

9. Después de la tripsinización hacer pasar la suspensión a través de tres capas de muselina. Resulta apropiado para estos casos un filtro Seitz estéril colocado sobre un matraz de filtración o Kitasaco con las capas de muselina en lugar de la membrana filtrante Seitz.

10. Pasar la suspensión celular desde el frasco Kitazato a un tubo de centrífuga cónico graduado. Si el volumen de la suspensión de células así lo aconseja, pueden utilizarse tubos con tapón de rosca de 125ml. En otros casos, emplear tubos de 50ml con tapón de rosca, tapón de goma con camisa abatible u otro tipo de tapones.

11. Centrifugar la suspensión de células en una centrífuga refrigerada a 4°C, a 1500 r.p.m. durante 10min; decantar el líquido sobrante. Adicionar igual cantidad de SSE nueva, mezclar bien y repetir el lavado dos veces. Decantar después del último lavado.

12. Si se utiliza más de un tubo de centrífuga, agregar una pequeña cantidad de SSE nueva a cada uno de ellos. Volver a suspender las células y reunir las en un sólo tubo de centrífuga, agregar

una pequeña cantidad de SSE nueva a cada uno de ellos. Volver a suspender las células y reunir las a un sólo tubo. Adicionar una pequeña cantidad de la misma solución que venimos empleando a uno de los tubos vacíos. Enjuagarlo bien con ella y aspirando el contenido con una pipeta, transferir el líquido a otro de ellos. Enjuagar éste y pasar el líquido contenido en el último de los tubos, resultante de todas las operaciones realizadas, se agrega al que contiene la suspensión celular.

Volver a centrifugar la suspensión mezclada y eliminar el líquido sobrenadante con ayuda de una pipeta.

13. El próximo paso a realizar es preparar una suspensión de células en el medio de cultivo a la concentración de uso deseada

Si la suspensión de células se va a preparar directamente de un volumen de células sedimentadas por centrifugación, hacer una dilución a 0.5×10^{-2} de células de riñón de mono en medio de crecimiento de Hanks, de pH 7.0-7.2 o bien, para el caso de las de riñón de feto de bovino, la misma dilución en medio de cultivo HLA, de pH 7.2-7.4 .

Si para esta cuenta celular se va a emplear el hemocitómetro, preparar la suspensión de células de riñón final a la dilución 0.3×10^{-6} para el de feto bovino.

Distribuir la suspensión de células de riñón de mono en los recipientes de cultivo, a razón de 0.5 a 0.8ml por tubo de 16 x 150 mm y 10ml por frasco plano e prescripción médica de tres onzas.

Para el cultivo de células de riñón de feto de bovino en tubos, preparar una dilución doble de la suspensión de células y distribuir a razón de un mililitro por tubo. Para el cultivo de frascos u otros recipientes emplear la suspensión señalada en el punto 13 y distribuir a razón de 10ml por frasco plano de prescripción médica de tres onzas y 4ml por frasco de Falcon para cultivo de tejidos .

15. Incubar los cultivos a 37°C. Después de 3 o 4 días, el medio de los cultivos de riñón de mono u otro mamífero en frascos de

be reemplazarse por otro medio que contenga doble volumen de CO_3 H_2Na . El medio de los cultivos en tubos debe reemplazarse con, aproximadamente, 1.5ml de medio de medio de mantenimiento de MEM-Eagle, 3 a 4 días después de la siembra, así como cada 5-7 días hasta que las células sean utilizadas.

El medio de los cultivos de riñón de feto bovino debe sustituirse a los 3 o 4 días por un medio que contenga suero al 2%, en lugar de al 10%. Para este tiempo los cultivos ya están listos para ser usados .

Apéndice 2 . Cultivo de Aspergillus flavus .

Para cultivar el hongo, se preparan 11 botellas de tipo Rouy de la siguiente manera: se colocan 60g de arroz en cada una de las botellas y se deja remojando durante dos horas, agitando constantemente. Después, se cambia el agua varias veces hasta que ésta salga clara, eliminándose el exceso de agua. El arroz debe estar extendido en el fondo de las botellas para después esterilizarlas en el autoclave a 15 libras durante 30 min.

Diez de las botellas son inoculadas con una cepa de A. flavus y se les cierra con tapones de algodón, los cuales deben ser cubiertos con papel aluminio. Una vez inoculado el arroz, las botellas deben agitarse para distribuir uniformemente el hongo. Después, deben incubarse a una temperatura de 29°C durante 10 días. Las botellas deben ser agitadas diariamente a partir del cuarto día. Una botella debe conservarse como testigo no inoculado para detectar si hubo contaminación.

EXTRACCIÓN DE AFLATOXINAS .

Pasado el período de incubación las botellas se sacan de la estufa de cultivo y deben ser pasadas al autoclave para destruir las esporas y así matar al hongo, a 15 libras durante 30 min.

Después de que se enfrían las botellas, se les agrega cloroformo en cantidad suficiente hasta dejar cubierto el grano, se deja remojando para remover las micotoxinas. 24 horas después se hace un filtrado recogiendo el cloroformo en un matraz y añadiendo nuevamente cloroformo a las botellas para desprender el máximo de aflatoxinas.

El cloroformo con la aflatoxina fue concentrado por calentamiento en baño María a 37°C para formar un extracto crudo .

PURIFICACIÓN Y SEPARACIÓN .

Una vez que se obtiene un extracto crudo se procede a purifi-

carlo por el método de cromatografía en columna.

Se utilizan dos columnas de vidrio Pyrex de 120cm de longitud por 2.5cm de diámetro. El extremo inferior de cada columna se cerró con un tapón de hule el cual tiene un tubito de vidrio para permitir la salida de los solventes. Sobre el tapón se colocan dos rodetes de papel filtro y enseguida se agregan 25g de sulfato de sodio anhidro.

Se agregan 250ml de n-hexano y después el gel de sílice hasta que alcance una altura de 40cm en la columna. Por último, se pone otra capa de 25g de sulfato de sodio anhidro. Una vez preparada la columna, se cubre con papel para evitar la desnaturalización de las micotoxinas por la luz. Después, se procede a la purificación del extracto poniéndolo en 400ml de hexano, poniendo la mitad a cada columna. Para hacer la elusión de los componentes del extracto se usan los siguientes solventes: a) 300ml de benceno a cada columna y b) 500ml de benceno-acetona (95:5). Por último, para hacer la elusión de las aflatoxinas se usan 300ml de metanol-cloroformo (3:97). Este último solvente arrastra las micotoxinas y se van recuperando en un frasco color ámbar. Después de la purificación, se concentra en baño María para hacer la separación.

La aflatoxina B₁ es separada por cromatografía en placa de capa fina. Las placas deben ser separadas por gel de sílice G, de acuerdo con el método descrito por Stubblefield.

Para correr las placas se colocan puntos de dos microlitros de extracto crudo a 1.5cm de alto de la base de la placa y como solvente, se usa una mezcla de cloroformo-acetona (97:3).

Después de que se identifican las aflatoxinas, de acuerdo con la migración en la placa de gel de sílice y su coloración con la luz ultravioleta se raspan de la placa y se separan en tubos viales.

La aflatoxina puede ser cuantificada por espectrofotometría.

Apéndice 3. Antecedentes históricos en el desarrollo de cultivo de tejidos. (Hayflick, 1975).

- 1885 Roux demostró que las células embrionarias podían ser mantenidas vivas en solución salina fuera del cuerpo del animal.
- 1907 Harrison cultivó espina dorsal, demostrando que los axones son producidos por extensiones de una sola célula nerviosa.
- 1910 Roux indujo un tumor usando un extracto filtrado de células tumorales de pollo; más tarde, mostró que contenían ARN-virus.
- 1913 Carrel demostró que las células podían crecer por varios períodos en cultivo bajo condiciones asépticas.
- 1948 Early y colaboradores aislaron células de la línea celular L y mostraron que formaban clones celulares en cultivo de tejidos.
- 1952 Gey y colaboradores establecieron una línea de células derivadas de cáncer cervicouterino las cuales volvían a tener un crecimiento normal. Línea celular HeLa.
- 1954 Levi-Montalcini y asociados demostraron que el factor de crecimiento nervioso (NGF) estimulaba el crecimiento de axones en cultivo de tejidos.
- 1955 Eagle hizo la primera investigación sistemática de los requerimientos esenciales y nutricionales en cultivo de tejidos y encontraron que las células animales podían propagarse en una mezcla determinada de moléculas.
- 1956 Puck y asociados seleccionaron mutantes con alteraciones de crecimiento para cultivo de células HeLa.
- 1958 Temin y Rubin desarrollaron un análisis cuantitativo para la infección de células de pollo en cultivo para purificarlas del virus de Roux. En la década siguiente, las características de éste y otros virus fueron establecidos por Stoker, Dulbecco, Green y otros virologos.
- 1961 Hayflick y Moorhead mostraron que los fibroblastos humanos mueren después de un número finito de divisiones en cultivo.

- 1954 Littieffeld introdujo medio HAM para el crecimiento selectivo de células somáticas híbridas. Junto con la técnica de fusión celular se lograron células somáticas accesibles. Kato y Takeuchi obtuvieron una planta de zanahoria en cultivo de tejidos.
- 1965 Ham introdujo un medio de suero libre capaz de soportar el crecimiento clonal de cientos de células de mamífero. Harris y Watkins produjeron las primeras células heterocarióticas de mamífero para inducir fusión de virus de humano con células de ratón.
- 1968 Augusti-Tocco y Sato adaptaron un tumor celular nervioso de ratón (neuroblastoma) a un cultivo de tejidos y aislaron clones que fueron excitables eléctricamente y que extendieron efectos nerviosos. Un número de otras líneas celulares diferenciadas fueron aisladas a partir de este cultivo.
- 1975 Kohler y Milstein produjeron los primeros anticuerpos monoclonales de líneas celulares.
- 1976 Sato y asociados publicaron el primero de una serie de reportes mostrando que las diferentes líneas celulares requieren diferentes mezclas de hormonas y factores de crecimiento en un medio de suero libre.