



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Estudio del efecto de
micotoxinas sobre la línea
celular SH-SY5Y de
neuroblastoma

Irene Nieto Fernández

Grado en Veterinaria

Año 2021

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Irene Nieto Fernández y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento NoComercial 4.0 Internacional”.



Resumen

Castellano

El impacto de las micotoxinas sobre la salud humana ha sido objeto de estudio en los últimos años, sin embargo, existe escasa información acerca de los efectos producidos por la presencia simultánea de micotoxinas reguladas y emergentes en los alimentos. En este trabajo se han evaluado los efectos de la micotoxina regulada deoxinivalenol (DON) y de la micotoxina emergente ácido fusárico (AF) sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Con este objetivo, se ha analizado el efecto de ambas toxinas sobre la viabilidad celular de forma individual y combinada utilizando el ensayo MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), obteniendo así sus concentraciones inhibitorias 50 (CI₅₀). Individualmente, el DON tiene una CI₅₀ de 0,93 µM, mientras que el AF presenta un valor de 75,02 µM. Al combinar el DON y el AF en proporción 2:1, las CI₅₀ resultantes son 1,62 y 0,81 µM para la micotoxina regulada y la emergente, respectivamente, por lo que muestran un efecto antagónico. Finalmente, se analizó el tipo de muerte producido por ambos compuestos por citometría de flujo, observándose que el AF produce apoptosis, mientras que el DON no genera apoptosis ni necrosis en esta línea celular. Debido al antagonismo observado, la co-contaminación de los alimentos con ambas micotoxinas podría producir en un efecto protector para el consumidor.

Palabras clave: micotoxinas, ácido fusárico, deoxinivalenol, citotoxicidad, antagonismo, apoptosis, emergente

Galego

O impacto das micotoxinas na saúde humana foi obxecto de estudo nos últimos anos, con todo, hai pouca información sobre os efectos producidos pola presenza simultánea de micotoxinas reguladas e emerxentes nos alimentos. Neste traballo avaliáronse os efectos da micotoxina regulada deoxinivalenol (DON) e da micotoxina emerxente ácido fusárico (AF) na liña celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Con este obxectivo, analizouse o efecto de ambas toxinas sobre a viabilidade celular individualmente e en combinación mediante a proba MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol), obtendo así a súa concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Individualmente, o DON ten unha CI₅₀ de 0,93 µM, mentres que o AF presenta un valor de 75,02 µM. Ao combinar o DON e o AF nunha proporción de 2:1, as CI₅₀ resultantes son 1,62 e 0,81 µM para a micotoxina regulada e a emerxente, respectivamente, polo que mostran un efecto antagónico. Finalmente, analizouse o tipo de morte producido por ambos compostos por citometría de fluxo, observándose que o AF produce apoptose, mentres que o DON non xera apoptose nin necrose nesta liña celular. Debido ao antagonismo observado, a co-

contaminación dos alimentos con ambas micotoxinas podría producir un efecto protector para o consumidor.

Palabras chave: micotoxinas, ácido fusárico, deoxinivalenol, citotoxicidade, antagonismo, apoptose, emerxente

English

The impact of mycotoxins on human health has been object of study in recent years. However, there is little information about the effects produced by the simultaneous presence of regulated and emerging mycotoxins in food. In this work, the effects of the regulated mycotoxin deoxinivalenol (DON) and the emerging mycotoxin fusaric acid (FA) have been evaluated on the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y. With this objective, the individual and combined effects of both toxins on cell viability have been analyzed using MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) assay, obtaining their half inhibitory concentrations (CI_{50}). Individually, DON has a CI_{50} of 0,93 μ M, while FA presents a value of 75,02 μ M. By combining DON and FA in a 2:1 ratio, the resulting CI_{50} are 1,62 and 0,81 μ M for the regulated and emerging mycotoxins, respectively, so they show an antagonistic effect. Finally, the type of cell death produced by both compounds was analyzed by flow cytometry, observing that FA induces apoptosis, while DON does not produce neither apoptosis nor necrosis on this cell line. Due to the observed antagonism, food co-contamination with both mycotoxins could produce a protective effect for the consumer.

Keywords: mycotoxins; fusaric acid; deoxinivalenol; cytotoxicity; antagonistic; apoptosis; emerging

Índice

Abreviaturas y acrónimos.....	4
1. Introducción	6
1.1. Micotoxinas.....	6
1.1.1. Toxicidad y regulación de las micotoxinas	8
1.2. Toxicidad combinada	11
1.2.1. Índice de combinación de Chou & Talalay	12
1.3. Tipos de muerte celular	13
1.3.1. Apoptosis o muerte celular tipo 1.....	14
1.3.2. Autofagocitosis o muerte celular tipo 2	15
1.3.3. Necrosis o muerte celular tipo 3.....	16
1.4. Tinciones para evaluar la viabilidad celular.....	17
1.4.1. MTT	17
1.4.2. Anexina V e Ioduro de propidio.....	18
2. Objetivos	20
3. Material y Métodos	21
3.1. Reactivos y materiales.....	21
3.2. Soluciones y medios de cultivo.....	21
3.3. Cultivo celular	21
3.4. Ensayo MTT.....	22
3.5. Citometría de flujo	22
3.6. Análisis estadístico.....	23
4. Resultados	23
4.1. Evaluación del efecto individual de las micotoxinas en la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y	23
4.2. Evaluación del efecto combinado de las micotoxinas sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y.....	28
5. Discusión.....	29
6. Conclusiones	33
7. Bibliografía	34

Abreviaturas y acrónimos

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AF: Ácido Fusárico

ATGs: Genes relacionados con la autofagia, del inglés “autophagy-related genes”

ATP: Adenosín Trifosfato

BEA: Beauvericina

BHE: Barrera hemato-encefálica

CO₂: Dióxido de carbono

CI₅₀: Concentración inhibitoria 50

DBH: Dopamina β-hidroxilasa

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco, del inglés “Dulbecco’s Modified Eagle’s médium”

DON: Deoxinivalenol

DISC: señal compleja de inducción de muerte, del inglés “Death Inducing Signaling Complex”

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, del inglés “European Food Safety Authority”

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, del inglés “Food and Agricultural Organization”

FB₁: Fumonisin B₁

FITC: Isotiocianato de fluoresceína, del inglés “Fluorescein Isotiocyanate”

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico

IP: Ioduro de propidio

LDH: Lactato deshidrogenasa

mTOR: del inglés “mammalian Target of Rapamycin”

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

NIV: Nivalenol

NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

RIP: Proteína quinasa de interacción con el receptor, del inglés “Receptor-interacting protein kinase”

SDS: sodio dodecil sulfato

STS: Estaurosporina

1. Introducción

1.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son un grupo de metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por diferentes especies de hongos filamentosos. Estos compuestos producen efectos tóxicos en los seres vivos a través de la contaminación de alimentos, piensos y otras materias primas, por lo que su ingesta es un problema de interés para la salud pública. Los síndromes de toxicidad resultantes de la ingesta de micotoxinas por parte del hombre y de los animales se conocen como micotoxicosis (Adeyeye, 2016; Sainz et al., 2018). Entre los diferentes tipos de hongos capaces de producir micotoxinas destacan el phylum Ascomycota, y dentro de él los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* (Figura 1) y *Penicillium*, de gran interés para la salud humana y animal dado que tienen la capacidad de colonizar plantas de cultivo destinadas al consumo (Gruber-Dorninger et al., 2017). Cabe destacar que el maíz es uno de los cereales más susceptibles de ser contaminado por micotoxinas, y que, junto al arroz y al trigo, supone el 94% del consumo total de cereales en el mundo (Ranum et al., 2014).

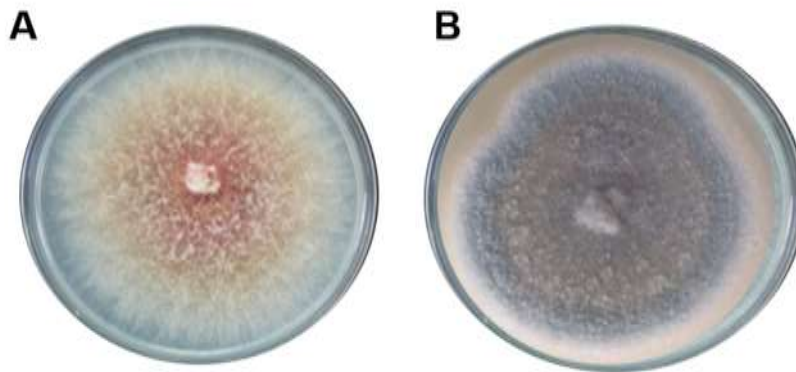


Figura 1. (A) Cultivo de *Fusarium* sp y (B) *Aspergillus* sp. Fotografías cedidas por J. González Jartín

Se han identificado más de 300 tipos de micotoxinas, pero solo alrededor de 20 pueden estar presentes en cultivos y alimentos a una concentración suficiente como para producir una toxicidad relevante. Desde el punto de vista de la salud pública, las micotoxinas más importantes son: las aflatoxinas, la ocratoxina A, la patulina, los tricotecenos, la zearalenona y las fumonisinas (Kifer et al., 2020; Sainz et al., 2018).

Basándonos en estos datos, no es de extrañar que la contaminación con micotoxinas suponga una gran amenaza para la salud humana. Esto se debe en gran medida a su estabilidad

física y química, ya que resisten a procesos de molienda, secado o cocción, lo que impide que puedan ser destruidas durante el tratamiento industrial. Otro factor importante es su capacidad de colonización de los cultivos, que puede ocurrir durante su crecimiento en el campo, viéndose favorecido por temperaturas extremas y alta humedad, o después de la cosecha, durante el almacenamiento, transporte y procesamiento (Sainz et al., 2018). En este sentido, el cambio climático está estrechamente relacionado con el aumento de la contaminación de los cultivos por micotoxinas. El aumento del CO₂, de la temperatura, y del estrés por sequía en los campos son elementos clave para el desarrollo de hongos micotoxigénicos, incluyendo las especies de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. El impacto del cambio climático sobre los cultivos europeos ha sido examinado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), concluyendo que los efectos variarán dependiendo del área geográfica y podrán ser perjudiciales o beneficiosos. Por ejemplo, se prevé que en el norte de Europa el aumento de las temperaturas resulte beneficioso para los cultivos, mientras que en la cuenca mediterránea los cambios extremos en las condiciones meteorológicas aumentarán gradualmente la contaminación con micotoxinas. El cambio climático también influye en el desequilibrio entre la relación patógeno/plaga, planta huésped y medio ambiente (Figura 2). Estudios recientes sugieren que plagas invasoras de cultivos básicos migran a los polos a una velocidad de 3-5 km/año, aumentando así el estrés ambiental al que se ven sometidas las plantas, y reduciendo su resistencia al desarrollo de micotoxinas. Por lo tanto, el cambio climático conllevará grandes impactos en la seguridad alimentaria en los diferentes continentes (Medina et al., 2017).

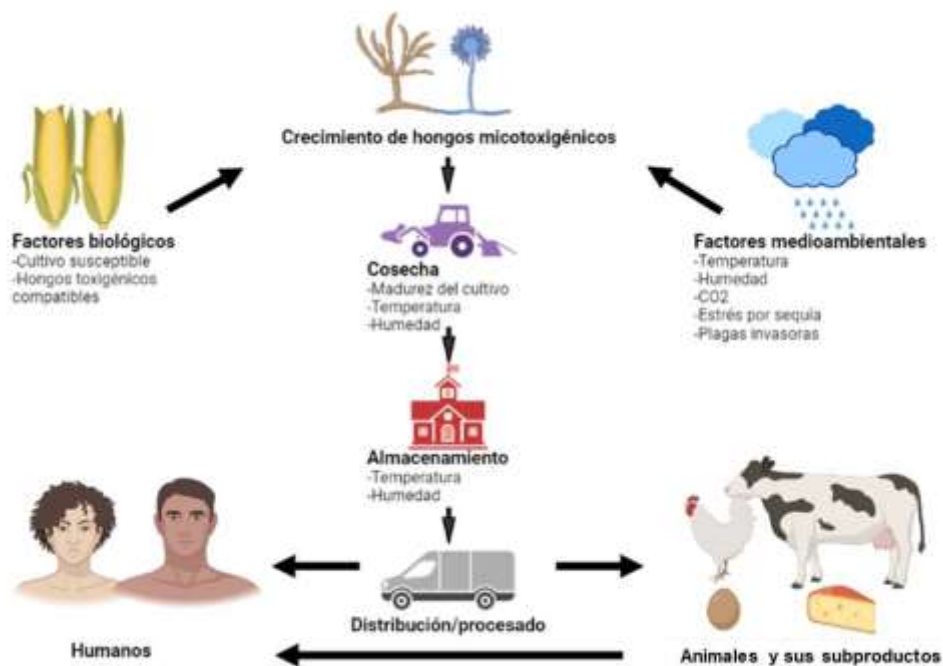


Figura 2. Esquema de las relaciones entre los diferentes factores que intervienen en el desarrollo de las micotoxinas y su impacto en la salud humana y animal

En este contexto, la vigilancia de piensos y cereales para detectar la presencia de micotoxinas ha sido objeto de extensas investigaciones en los últimos años (Liu & Van der Fels-Klerx, 2021; Sainz et al., 2018).

1.1.1. Toxicidad y regulación de las micotoxinas

Los efectos tóxicos asociados a la exposición a las micotoxinas pueden ser agudos o crónicos. Esto dependerá del tipo de micotoxina, del nivel y duración de la exposición, y en el caso de que afecte a animales de producción, de su especie y edad. En concreto, la exposición crónica es especialmente relevante. Ésta puede estar causada por la ingestión de cantidades pequeñas o moderadas de micotoxinas que se encuentren en cereales, y podría dar lugar al desarrollo de cáncer o inmunosupresión. Otros efectos que se han demostrado como consecuencia de estas intoxicaciones por consumo de micotoxinas o micotoxicosis son nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, problemas reproductivos, efectos gastrointestinales, problemas dermatológicos, y desórdenes del sistema nervioso central (Sainz et al., 2018).

Aunque la ingesta accidental de alimentos contaminados por micotoxinas es probablemente la principal vía de contacto tanto para el hombre como para los animales, no debemos olvidar la existencia de otro tipo de vías. Estas incluyen el contacto directo con ciertos compuestos tóxicos que traspasan la barrera de la piel, o el consumo de productos procedentes de animales alimentados con cereales contaminados, tales como carne y leche. Aunque es menos común, también se ha demostrado la existencia de micotoxicosis producidas por vía inhalatoria (Seyedmousavi et al., 2018).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que aproximadamente entre el 25% y 50% de todos los alimentos básicos producidos a nivel mundial están contaminados por micotoxinas, por lo que no es de extrañar que en la mayoría de los países cuenten con una regulación específica sobre los límites máximos permitidos de las micotoxinas que con más frecuencia afectan al hombre. El fin de dicha legislación es prevenir y reducir los riesgos para el consumidor y minimizar el impacto económico causado por la presencia de estas sustancias en los cultivos (Gruber-Dorninger et al., 2017).

La EFSA clasifica a las micotoxinas en dos grandes grupos: micotoxinas reguladas y micotoxinas no reguladas o emergentes. Las micotoxinas reguladas son aquellas que, conociendo la concentración a la que actúan, suponen un peligro para la salud pública, y cuyos niveles máximos están recogidos en la normativa europea mediante el Reglamento (CE) nº1881/2006 de la Comisión Europea del 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Por otro lado, las micotoxinas no reguladas son aquellas cuyo consumo no se considera peligroso para la salud

pública, aunque en muchos casos su pertenencia a este grupo se basa en el desconocimiento y falta de estudio de su acción, por lo que no podemos descartar que ninguna de ellas pueda afectar a la salud humana y/o animal (EFSA, 2014; Juan-García et al., 2019; MAPA, 2015).

1.1.1.1. Micotoxinas reguladas

Como se ha mencionado anteriormente, las micotoxinas reguladas son aquellas que, conociendo su umbral de toxicidad, suponen un peligro para la salud pública y sus concentraciones máximas en los alimentos quedan recogidas en el Reglamento (CE) n°1881/2006. Dentro de este grupo encontramos las clases de micotoxinas más importantes: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxinas y zearalenona (EFSA, 2014; Gruber-Dorninger et al., 2017). A continuación, se describirán las principales características del deoxinivalenol (DON), la micotoxina regulada utilizada en este trabajo.

1.1.1.1.1. Deoxinivalenol

El DON o vomitoxina (Figura 3) es una micotoxina perteneciente al grupo de los tricotecenos tipo B, producida principalmente por hongos del género *Fusarium*. Se trata del tricoteceno más común en los cereales, y se ha demostrado que la exposición a esta toxina tiene un efecto directo en las células del individuo, provocando la ruptura de la membrana celular, dañando su ADN, e inhibiendo la síntesis de proteínas (Pestka, 2010).

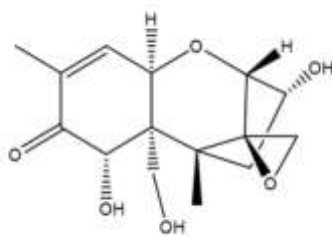


Figura 3. Estructura química del DON

El consumo de alimentos contaminados con DON induce micotoxicosis tanto en animales de granja como en humanos. Los síntomas más conocidos que produce el DON son diarreas, vómitos, anorexia, reducción en la ganancia de peso, alteraciones neuroendocrinas e inmunológicas, leucocitosis, hemorragia y shock circulatorio. Sin embargo, solo la ingesta de cantidades extremadamente altas de DON ha sido reportada como causa de muerte o de grave daño tisular, mientras que lo más común en una ingestión regular de dosis bajas de esta toxina será el rechazo hacia el alimento y la pérdida de peso que eso conlleva. Es la capacidad para

provocar el vómito en diferentes especies lo que ha hecho que esta micotoxina se conozca comúnmente como vomitoxina (Bonnet et al., 2012; Sainz et al., 2018; Zhang et al., 2020).

La intensidad de los síntomas depende de diferentes factores tales como la dosis, la especie que lo consume, la duración de la exposición, la vía de administración o la pureza del compuesto. Por ejemplo, la absorción oral es baja en rumiantes y aves de corral, mientras que en suidos y roedores se absorbe fácilmente. En suidos, una dosis de 1 a 2 ppm de DON causa un rechazo parcial al alimento, mientras que si la dosis asciende a 12 ppm se produce el rechazo completo (Bonnet et al., 2012; Sainz et al., 2018). En humanos, los síntomas más comunes de esta micotoxicosis son vómitos, reducción en la ingesta, dolor abdominal y diarrea, y aunque está demostrado que esta toxina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en el cerebro, el mecanismo por el que causa neurotoxicidad es aún objeto de estudio (Bonnet et al., 2012; Zhang et al., 2020).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JEFSA), estableció en 2010 la ingesta diaria máxima tolerable provisional de DON y sus derivados para exposición crónica en 1 µg/peso corporal en kg/día, mientras que la dosis de referencia en una exposición aguda sería de 8 µg/peso corporal en kg/día (AESAN, 2021). En la Unión Europea, el Reglamento (CE) nº1881/2006 de la Comisión Europea, establece el límite máximo permitido de DON para alimentación humana entre 200 µg/g para alimentos procesados a base de cereales y alimentación infantil y 1750 µg/g para cereales sin procesar.

1.1.1.2. Micotoxinas no reguladas

Las micotoxinas no reguladas son aquellas cuya presencia en alimentos no se determina rutinariamente y cuyos límites máximos no se encuentran recogidos en la legislación actual. Sin embargo, la incidencia de estas micotoxinas aumenta cada vez más, recibiendo también el nombre de micotoxinas emergentes (Arroyo-Manzanares et al., 2019; Gruber-Dorninger et al., 2017). En el presente trabajo se ha analizado la micotoxina no regulada ácido fusárico (AF), que se describe en la siguiente sección.

1.1.1.2.1. Ácido Fusárico

El AF (Figura 4) es una micotoxina emergente y poco estudiada producida por varias especies de hongos del género *Fusarium*. Como la mayoría de las micotoxinas producidas por este género, es relevante por su impacto sobre la salud animal y del ganado, y ha demostrado tener efectos citotóxicos e inhibitorios en el crecimiento de distintas líneas celulares, algunas de ellas cancerígenas (Gruber-Dorninger et al., 2017; Mamur et al., 2020).

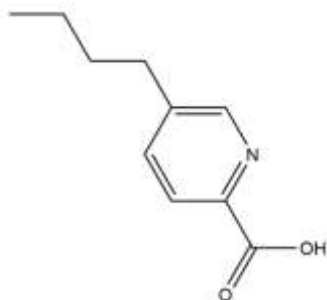


Figura 4. Estructura química del AF

Aunque individualmente la toxicidad del AF se considera baja o moderada, la importancia de esta micotoxina radica en las interacciones sinérgicas que produce con otras micotoxinas en la naturaleza (Bacon et al., 1996).

Su efecto más conocido es la hipotensión que provoca debido a la inhibición de la dopamina β -hidroxilasa (DBH), la enzima encargada de convertir la dopamina en noradrenalina. Apenas hay datos acerca de sus efectos en humanos, pero se ha demostrado que el AF es capaz de producir estrés oxidativo y mitocondrial, necrosis y apoptosis en células de carcinoma hepático (Gruber-Dorninger et al., 2017). En animales, su efecto tóxico se asocia con vómitos, pérdida de apetito y letargia, y también se ha demostrado que altera la actividad mitocondrial, inhibiendo la síntesis de ATP. El efecto de esta toxina sobre el cerebro no es conocido, aunque sí se ha demostrado que es neurológicamente activa y que puede afectar negativamente al envejecimiento cerebral, predisponiendo a desórdenes neurodegenerativos (Dhani et al., 2020; Gruber-Dorninger et al., 2017).

1.2. Toxicidad combinada

En la naturaleza, la contaminación con micotoxinas en especies vegetales suele producirse de forma combinada. Los cereales pueden estar infestados a la vez por distintas especies de hongos de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* o *Penicillium* que producen varias micotoxinas que, por tanto, co-contaminarán los alimentos. Este hecho queda avalado por diferentes estudios, en los que también se concluye con la importancia de continuar estudiando los efectos tóxicos que produce la combinación no solo de micotoxinas reguladas, sino también de las emergentes (Arroyo-Manzanares et al., 2019; Romera et al., 2018; Streit et al., 2013). De hecho, en Europa se estima que entre el 75 y el 100% de muestras destinadas a alimentación animal contienen más de una micotoxina (Ashton, 2015; Streit et al., 2012).

Podemos explicar la gran frecuencia con la que se da esta combinación de micotoxinas en alimentos por tres motivos: un mismo hongo es capaz de producir distintos tipos de micotoxinas

simultáneamente, un mismo producto o materia prima puede estar contaminado por varios hongos, y el producto resultante puede haber sido creado a partir de distintas materias primas contaminadas (Streit et al., 2012)

Por tanto, la presencia de varias micotoxinas en las materias primas destinadas a la alimentación, tanto humana como animal, podría suponer un peligro para la salud, ya que se desconocen la mayoría de los efectos derivados de la combinación de estos metabolitos. Es por esto que es importante estudiar el tipo de efecto que conlleva la combinación de distintas micotoxinas, puesto que cabe la posibilidad de que una micotoxina combinada con otra sea más tóxica que esa misma toxina individualmente (Speijers & Speijers, 2004).

La clasificación de los posibles efectos combinados se basa en la comparación entre el efecto observado y el efecto esperado. Si el efecto observado es mayor que el esperado, ambos compuestos presentarán efecto sinérgico; si el efecto observado es menor que el esperado, serán antagonistas, y si el efecto esperado es igual al observado, diremos que tienen efecto aditivo (Kifer et al., 2020). Existen varios métodos para evaluar el efecto que produce la combinación de varios compuestos y que nos permiten clasificar esta interacción como efectos antagónicos, aditivos o sinérgicos. Evaluar el efecto de esta combinación será fundamental en lo relativo a la seguridad alimentaria, ya que si la mezcla de varias micotoxinas produjese efectos sinérgicos podrían dar lugar a toxicidad aun estando por debajo de los límites permitidos (Ashton, 2015).

En este estudio utilizaremos el índice de combinación de Chou & Talalay para analizar el efecto producido en la combinación *in vitro* del DON y el AF, por lo que se describirá a continuación.

1.2.1. Índice de combinación de Chou & Talalay

El método de Chou & Talalay para la combinación de fármacos se basa en una ecuación derivada del principio de la ley de masas, que establece que para una reacción química reversible y en equilibrio, debe existir una relación constante entre concentraciones de reactivos y productos. Establece así una fórmula que unifica las ecuaciones de Michaelis-Menten, Hill, Henderson-Hasselbach y Scatchard en bioquímica y biofísica (Chou & Talalay, 1984):

$$\text{Índice de combinación} = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

donde a y b son las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) de los compuestos combinados, y A y B las CI_{50} de los compuestos individualmente.

Con el índice de combinación resultante obtenemos una definición cuantitativa del efecto aditivo (si es igual a 1), sinérgico (si es menor que 1), o antagónico (si es mayor que 1) (Chou, 2010; Chou & Talalay, 1984; Kifer et al., 2020).

1.3. Tipos de muerte celular

A lo largo del ciclo vital de las células encontramos tres procesos: desarrollo, diferenciación, y muerte. Se asume que en condiciones fisiológicas este fenómeno está regulado bajo un complejo equilibrio entre la proliferación de células nuevas y la muerte de células dañadas o seniles, creando una homeostasis esencial para el correcto mantenimiento de los tejidos. Cuando este equilibrio se altera, nos encontramos con patologías como el cáncer (aumento de la proliferación celular) o enfermedades degenerativas (aumento de los procesos de muerte celular) (Ramanpreet et al., 2021).

Atendiendo a las diferentes rutas y mecanismos implicados, en las células de los mamíferos encontramos tres tipos de muerte: apoptosis (tipo 1), autofagia (tipo 2), y necrosis (tipo 3) (Tabla 1) (Ouyang et al., 2012).

Tabla 1. Comparación de características citomorfológicas de los procesos de muerte celular apoptosis, autofagia y necrosis (Martínez Salazar, 2009; Ramanpreet et al., 2021)

Parámetro	Apoptosis o muerte celular tipo I	Autofagia o muerte celular tipo II	Necrosis o muerte celular tipo III
Núcleo	Reducción de volumen, fragmentación del núcleo	Poca alteración, dilatación del espacio perinuclear	Dilatación de la membrana nuclear
Cromatina	Condensación	Media/moderada condensación	Fragmentación
Citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Presencia de vacuolas autofágicas	Liberado al espacio extracelular
Membrana plasmática	Membrana celular intacta	-	Membrana celular comprometida
Volumen celular	Encogimiento celular	-	Hinchamiento celular, citólisis
Proceso de inflamación tisular	No hay presencia de inflamación	Posibilidad de inflamación	Inflamación usualmente presente
Activación de las caspasas	Involucradas	No involucradas	No involucradas

1.3.1. Apoptosis o muerte celular tipo 1

La apoptosis, o muerte celular programada tipo 1, es el tipo principal de muerte celular que ocurre cuando las alteraciones en el ADN de las células son irreparables. Los procesos patológicos en los que esto ocurre son enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, inmunológicas, y procesos cancerígenos, aunque también está descrita en procesos fisiológicos. Por ejemplo, en muchas especies, la apoptosis ocurre durante el proceso de desarrollo embriológico y fetal para eliminar células del sistema nervioso y permitir la diferenciación. Este tipo de muerte celular está caracterizada por cambios morfológicos y bioquímicos específicos en las células sobre las que actúa, incluyendo la contracción de las células, la condensación y fragmentación del núcleo, la aparición de una ampolla en la membrana plasmática, y la pérdida de adhesión a células vecinas o a la matriz extracelular. Todos estos cambios son coordinados por unas enzimas pertenecientes a la familia de las cisteín-proteasas llamadas caspasas (Ouyang et al., 2012; Ramanpreet et al., 2021).

Existen dos rutas principales que pueden intervenir en la activación de la apoptosis, pudiendo diferenciar entre ellas la vía intrínseca o mitocondrial, o la vía extrínseca o de receptor de muerte (Figura 5). En ambas vías intervienen las caspasas y tienen como resultado en las células los cambios morfológicos y bioquímicos anteriormente descritos.

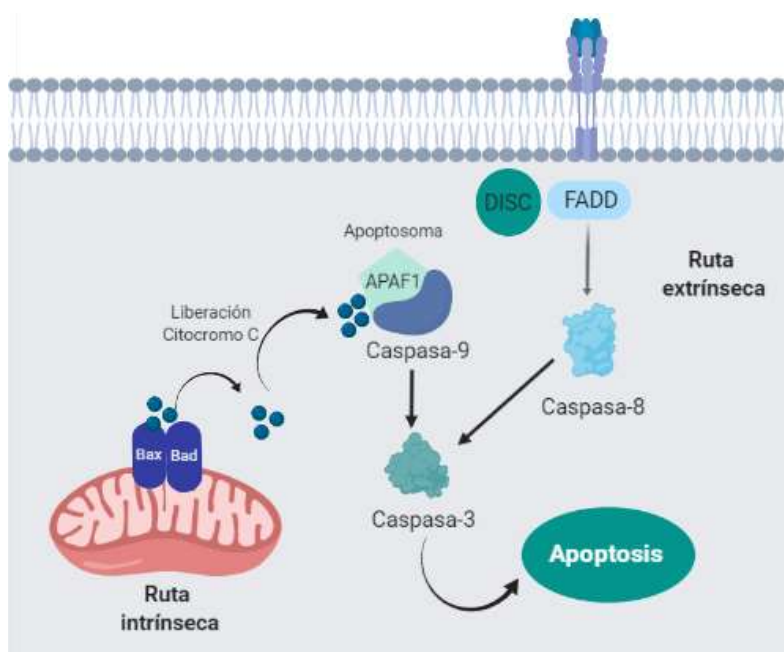


Figura 5. Esquema de la apoptosis por vía extrínseca e intrínseca. Modificado de (Alvariño Romero, 2019)

La apoptosis extrínseca depende de la unión de un ligando a receptores de muerte localizados en la membrana plasmática. Los ligandos más conocidos son los FasL/FasR y TNF- α /TNRF1, y al unirse crean un complejo en la cara interna de la membrana plasmática llamado

DISC (del inglés “Death Inducing Signaling Complex”), que hace que la señal de muerte se transmita desde la superficie de la célula hasta el medio intracelular, lo que activa la caspasa 3 a través de la caspasa 8 y se inicia el proceso apoptótico.

Por otro lado, la apoptosis intrínseca se inicia a través de estímulos que no están mediados por receptores y que se transmiten al interior de la célula generando señales intracelulares que llegan a las mitocondrias. Estas señales deben dar lugar a diversos estímulos que inhiben la proteína anti-apoptótica Bcl-2, permitiendo la apertura del poro mitocondrial. Una vez abierto, comienza la liberación de factores inductores de la apoptosis desde el interior mitocondrial, entre los que se encuentran el citocromo c, la smac/DIABLO y la endonucleasa G, activando así las caspasas 9 y 3, con las cuales comienza la cascada apoptótica. Además, la endonucleasa G y los factores inductores de apoptosis se dirigen al núcleo celular, dando lugar a la fragmentación del ADN y la condensación de la cromatina (Fernández Araujo, 2015; Ouyang et al., 2012; Ramanpreet et al., 2021).

1.3.2. Autofagocitosis o muerte celular tipo 2

La autofagia, aunque menos común que la apoptosis, es un importante mecanismo de muerte celular que se caracteriza por ser un proceso catabólico, independiente de las caspasas, y altamente regulado por genes relacionados con la autofagia (ATGs).

La función principal de esta vía es promover la supervivencia celular mediante el reciclaje de componentes celulares, lo que le proporcionará a la célula la energía mínima necesaria para mantenerse. La autofagia se activa como mecanismo de supervivencia tras recibir señales de estrés tanto intra como extracelulares, cuando, por ejemplo, la célula tiene déficit de nutrientes. Otro ejemplo bien conocido de la activación de la autofagia ocurre durante el desarrollo animal, en concreto en el proceso de metamorfosis larva-pupa, en el que se requieren una serie de ATGs para degradar el intestino medio larval. Sin embargo, la sobreactivación de este sistema puede resultar en una muerte celular dependiente de la autofagia (Denton & Kumar, 2019).

El principal responsable de la regulación del proceso de autofagia que se activa cuando la célula se encuentra con escasez de nutrientes es la proteína mTOR (del inglés “mammalian target of rapamycin”). Esta proteína del grupo de las quinasas es ampliamente conocida por integrar una gran cantidad de rutas relacionadas con el crecimiento celular. Su función reguladora depende de sus dos subunidades: TORC1 y TORC2. En presencia de nutrientes y señales de crecimiento, TORC1 previene la autofagia fosforilando e inhibiendo la actividad del complejo Atg1/ULK1. Sin embargo, en situación de inanición, TORC1 queda inactivo, lo que permite la activación del Atg1 y con ello el inicio de la autofagia. La autofagia termina con la fusión del autofagosoma y el lisosoma, formando un autolisosoma para la degradación o

reciclaje de componentes celulares (Figura 6) (Denton & Kumar, 2019; Fernández Araujo, 2015; Murrow & Debnath, 2013; Ouyang et al., 2012).

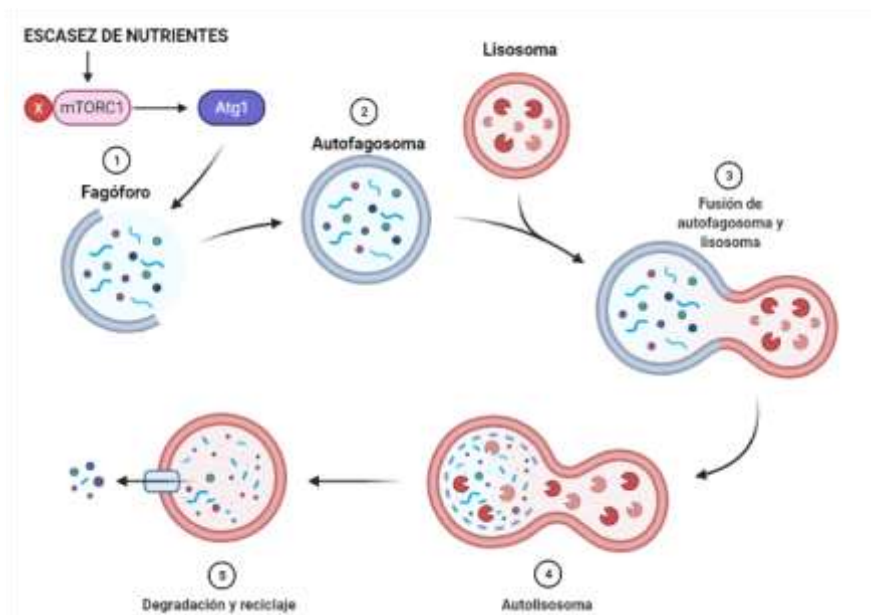


Figura 6. Esquema del mecanismo de autofagia celular en situación de inanición. Ante la escasez de nutrientes, la proteína mTORC1 queda inactivada, lo que permite la activación del Atg1 y en consecuencia el inicio de la autofagia. Se diferencian las distintas fases: 1) comienzo del aislamiento de la membrana o fagóforo; 2) formación de la doble membrana que forma el autofosoma; 3) fusión del autofosoma y lisosoma; 4) formación del autolisosoma; 5) degradación y reciclaje del contenido celular

1.3.3. Necrosis o muerte celular tipo 3

La necrosis es un tipo de muerte celular no controlada caracterizada por una serie de eventos que desencadenan la ruptura de la membrana plasmática y la consecuente salida de material intracelular, dando lugar a una reacción inflamatoria en los tejidos circundantes. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que también puede iniciarse de forma controlada mediante vías de señalización específicas entre las que intervienen principalmente las proteínas RIP1 y RIP3 (del inglés “receptor-interacting protein kinase”), por lo que también juega un importante papel en la eliminación de células dañadas (Fernández Araujo, 2015; John W Baynes, 2019).

Los cambios celulares que encontramos en la necrosis y que nos pueden ayudar a identificar este tipo de muerte celular mediante diversas tinciones son: aumento del volumen celular, presencia de ADN fragmentado en el citosol, ruptura de la membrana plasmática y salida del material intracelular. Además, se está comenzando a estudiar la forma de identificar la necrosis controlada mediante las vías de señalización anteriormente mencionadas.

Hasta hace poco se pensaba que la aparición de necrosis en las células estaba necesariamente ligada a la carencia de ATP. Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el agotamiento del ATP no es el único fenómeno crítico capaz de iniciar este proceso, sino que otras causas como el aumento del Ca^{+2} intracelular, la oxidación, o ciertas infecciones como la inducida por *Mycobacterium tuberculosis* también son capaces de activar la necrosis celular (Ramírez Agudelo & Rojas López, 2010).

1.4. Tinciones para evaluar la viabilidad celular

La viabilidad celular se define como el número de células funcionales en una muestra. Evaluar la viabilidad celular es de interés en numerosos ensayos celulares, sobre todo en aquellos que se relacionan con la toxicidad. Los ensayos que evalúan la viabilidad celular pueden diferenciarse en aquellos que analizan la población celular en su totalidad, y aquellos que se centran en el análisis de células individuales. Existen diferentes tinciones y métodos que podemos utilizar para evaluar la viabilidad celular, y dependerá de su coste, velocidad y complejidad del equipamiento requerido el que elijamos uno u otro (Stoddart, 2011).

A continuación, se describirán las tinciones para determinar la viabilidad celular que se han utilizado en el presente trabajo.

1.4.1. MTT

El MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio utilizado para determinar la cantidad de células viables en una muestra. Esta determinación está basada en un método colorimétrico, ya que el MTT se transforma en cristales insolubles de formazán de color azulado tras el proceso de reducción que es llevado a cabo por las deshidrogenasas mitocondriales (Figura 7). Los cristales de formazán formados tras la reducción del MTT se pueden solubilizar con distintos disolventes, permitiendo la lectura de la absorbancia a longitudes de onda entre 540 y 595 nm, y la señal será proporcional al número de células viables. Debido a que la actividad mitocondrial está relacionada con la viabilidad en la mayoría de los tipos celulares, este ensayo permite evaluar la viabilidad basándose en la actividad metabólica de la célula (Kupcsik, 2011).

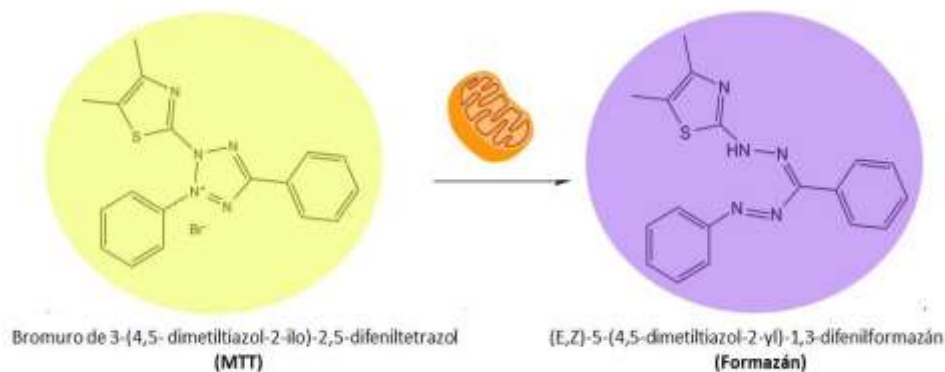


Figura 7. Reacción de reducción del MTT en las mitocondrias. Modificada de (Grant, 2014)

El ensayo MTT se ha convertido en un método de evaluación de viabilidad celular estandarizado, aplicado principalmente para testar la toxicidad de productos farmacéuticos o de sus combinaciones, y de fármacos anticancerígenos a diferentes concentraciones. Por ejemplo, este ensayo ha sido utilizado sobre células de leucemia linfoblástica aguda pediátrica, evaluando la viabilidad celular de ciertos medicamentos para poder predecir su efecto *in vivo*. Otra de sus aplicaciones es evaluar la resistencia a medicamentos (van Meerloo et al., 2011).

La capacidad de reducción de la célula depende de la cantidad de NADH y NADPH que contenga, que a su vez se ve comprometida por la cantidad de glucosa extracelular disponible. Por tanto, un medio celular agotado tendrá menor concentración de estas sustancias, producirá una menor reducción, veremos un color poco azulado, y la lectura de su absorbancia de MTT será baja (Kupcsik, 2011).

1.4.2. Anexina V e Ioduro de propidio

La tinción con Anexina V e ioduro de propidio (IP) permite diferenciar las células en necrosis y en apoptosis. Morfológicamente existe una clara distinción entre las células que sufren procesos de apoptosis y las que sufren necrosis. En las células en apoptosis se distingue una disminución del volumen celular, fragmentación del ADN y formación de cuerpos apoptóticos, mientras la membrana celular queda intacta. En la necrosis observamos la lisis de la membrana celular, la dilatación del citoplasma y del núcleo, y la descomposición de las organelas (Pietkiewicz et al., 2015).

La Anexina V es una proteína que se une de forma específica a residuos de fosfatidilserina, que se encuentran expuestos en la cara externa de la membrana plasmática cuando se desencadena la apoptosis. Esto la convierte en un biomarcador efectivo de células apoptóticas,

en las cuales esta membrana celular sigue existiendo. La Anexina V no es fluorescente, por lo que se conjuga con diferentes fluoróforos para poder identificar a las células en apoptosis, como es el caso del isotiocianato de fluoresceína (FITC, del inglés “Fluorescein Isotiocyanate”). Para diferenciar células apoptóticas de células necróticas, combinamos la Anexina V con un marcador de ADN que no sea permeable a la membrana a menos que esta se encuentre dañada, como es el caso del marcador catiónico IP. De esta forma, con la combinación de ambas tinciones podemos distinguir entre células en apoptosis, que serán positivas a la Anexina V, y células necróticas, negativas a la Anexina V y positivas al IP (Figura 8). La fluorescencia emitida por ambas moléculas se puede monitorizar por citometría de flujo (Martínez Salazar, 2009).



Figura 8. Esquema del funcionamiento de las tinciones Anexina V-FITC (verde) y Ioduro de propidio (rojo). La Anexina V actúa como marcador de apoptosis uniéndose a los fosfolípidos de la cara externa de la membrana que se externalizan cuando la célula entra en apoptosis, y el IP penetra en la célula en necrosis cuando se pierde la integridad de la membrana, tiñendo el ADN

2. Objetivos

La contaminación de alimentos con micotoxinas supone un problema para la salud pública que se está viendo agravado por el cambio climático, ya que el aumento de la temperatura y la humedad favorecen la aparición de hongos micotoxigénicos. Actualmente, el mecanismo de acción de estas toxinas, así como sus efectos en combinación, son prácticamente desconocidos. En este contexto, los objetivos de este Trabajo Fin de Grado son:

- Evaluar los efectos individuales de las micotoxinas DON y AF sobre la viabilidad de la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y
- Analizar el tipo de muerte producido por las micotoxinas DON y AF en las células SH-SY5Y
- Estudiar los efectos *in vitro* sobre la viabilidad celular de la combinación de DON y AF en la proporción encontrada en muestras naturalmente contaminadas

3. Material y Métodos

3.1. Reactivos y materiales

Las micotoxinas DON y AF (pureza >98%), la estaurosporina (STS), la saponina y el MTT se obtuvieron en Merck (Madrid, España). Las células SH-SY5Y se obtuvieron en la American Type Culture Collection (número CRL2266). El medio de cultivo Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM)/F12, el suero fetal bovino (FBS), la penicilina/estreptomicina y la tripsina/EDTA se compraron en Thermo Fisher Scientific (Madrid, España). La solución Detachin™ se obtuvo de Genlantis (San Diego, EE. UU.). El kit de detección de apoptosis Anexina V-FITC/IP se compró en Immunostep (Salamanca, España). Las placas de cultivo de 96 y 12 pocillos, así como los frascos de cultivo celular, se obtuvieron de Jet Biofil (China).

3.2. Soluciones y medios de cultivo

Para realizar los ensayos se han utilizado las siguientes soluciones stock, tampones salinos y medios de cultivo:

- Soluciones de DON y AF: la solución stock de las micotoxinas se preparó en DMSO, y se mantuvieron almacenadas a -20 ° C en viales de vidrio xilenizado. Las diluciones seriadas se realizaron en medio de cultivo.
- Medio de cultivo celular: DMEM/F12 en proporción 1:1 que contiene 1% de glutamax, 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina) y 10% de FBS (suero fetal bovino). Además, incluye el indicador de pH rojo fenol.
- Solución salina Locke's, utilizada en el ensayo de MTT para disolver el indicador y lavar el medio. Consta de los siguientes componentes expresados en mM: NaCl a 154; KCl a 5,6; NaHCO₃ a 3,6; CaCl₂ a 1,3; MgCl₂ a 1; HEPES (Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico) a 10; glucosa a 5 (pH 7,2-7,4).
- PBS (del inglés "phosphate buffered saline"): solución salina utilizada durante el protocolo de detección de apoptosis mediante la tinción Anexina V-FITC/IP, compuesta por: NaCl 137 mM; KCl 3,2 mM; Na₂HPO₄ 8,2 mM y KH₂PO₄ 1,5 mM. Su pH debe ser de 7,4.
- Tampón de unión de Anexina V-FITC al 1%, utilizada en el kit de detección de apoptosis con esta tinción, constituido por Hepes 0,01 M, NaOH 0,01 M, NaCl 0,14 M y CaCl₂ 2,5 mM (pH 7,4).

3.3. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y, cultivada en el medio DMEN/F12 anteriormente descrito. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, con una

atmósfera humidificada, con un 95% de aire y un 5% de CO₂, y se disociaron una vez a la semana usando tripsina/EDTA a un 0,05%. Para el subcultivo celular, se realizó una dilución 0,3:10 de las células disociadas, añadiendo 0,3 mL de la suspensión celular a 9,7 mL de medio en frascos de cultivo de 25 mL.

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos a una concentración de 5×10^4 células/pocillo para el ensayo de MTT, y en placas de 12 pocillos con 5×10^5 células/pocillo para el ensayo de citometría de flujo.

3.4. Ensayo MTT

Como se ha explicado anteriormente, el efecto de las micotoxinas sobre la actividad metabólica de las células fue evaluado mediante el ensayo MTT. Para llevarlo a cabo, se cultivaron las células SH-SY5Y en placas de 96 pocillos de fondo plano a una concentración de 5×10^4 células/pocillo, añadiendo 200 µL de suspensión celular en cada pocillo. Las células se incubaron a una temperatura de 37°C con una atmósfera humidificada al 5% de CO₂ y 95% de aire durante 24 horas. Pasadas estas 24 horas, se trataron las células con las micotoxinas a evaluar en un rango de concentraciones entre 0,1 y 10 µM para el DON y 0,1 y 100 µM para el AF, con el objetivo de determinar la CI₅₀ de ambas. La saponina se utilizó como control de muerte a 1 mg/mL, concentración que se determinó anteriormente realizando una curva dosis-respuesta con este compuesto.

Para evaluar la toxicidad de ambas micotoxinas en combinación se utilizó una proporción de concentraciones 2:1 de DON y AF, respectivamente. Dicha ratio se determinó en base a estudios previos realizados en muestras naturales contaminadas de la Península Ibérica (González-Jartín et al., manuscrito en preparación). En los tratamientos con las toxinas combinadas se usó la CI₅₀ de ambos compuestos como control.

Tras 24 horas de incubación con los compuestos, las células se lavaron tres veces con tampón Locke's y se añadieron 200 µl/pocillo de MTT (500 µg/mL) disuelto en Locke's. La placa se incubó durante 1 hora a 37°C y 300 rpm, se aspiró el exceso de MTT y, finalmente, se añadió sodio dodecil sulfato (SDS) al 5% para disolver los cristales de formazán. La absorbancia del MTT se midió a 595 nm en un lector de placas Sinergy 4 (BioTek). La absorbancia de la saponina a 1 mg/mL se utilizó como blanco y se restó del resto de medidas.

Para cada uno de estos experimentos se realizaron al menos tres réplicas independientes por triplicado.

3.5. Citometría de flujo

Para comprobar qué tipo de muerte celular producen los compuestos, se utilizó el kit de Detección de Apoptosis de Anexina V-FITC previamente descrito.

Las células SH-SY5Y se cultivaron en placas de 12 pocillos a una concentración de 5×10^5 células/pocillo durante 24 horas. Tras este tiempo, se trataron con las micotoxinas durante 24 horas a la CI_{50} calculada con el ensayo MTT. Como control inductor de apoptosis para este experimento se utilizó la STS a una concentración de $0,05 \mu\text{M}$ (Rouco et al., 2020). Para disociar las células se utilizó Detachin™ como alternativa menos agresiva que la tripsina/EDTA, y después se lavaron con PBS y se resuspendieron en el tampón de unión de Anexina V-FITC. Se añadieron la Anexina V-FITC y el IP y se incubaron las células durante 15 minutos a temperatura ambiente. Por último, volvieron a ser resuspendidas en PBS y después filtradas. La fluorescencia de 10000 eventos se analizó mediante citometría de flujo a 488 nm de excitación y 520 y 620 nm de emisión. Para la adquisición de los datos se utilizó el equipo ImageStreamMKII (Amnis Corporation, Luminex Corp, Austin, EE. UU.) y el software IDEAS Application 6.0 (Amnis Corporation, Luminex Corp).

3.6. Análisis estadístico

Los datos se expresan como la media \pm SEM (error estándar de la media) de las réplicas independientes realizadas. Se realizó una comparación estadística mediante la prueba de t de Student para datos no pareados, considerándose como significativos los valores $p < 0,05$.

La CI_{50} de los compuestos individualmente y en combinación se obtuvo ajustando los datos con un modelo $\log(\text{inhibidor})$ vs respuesta en el software Graph Pad Prism 8.

Los efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos de los compuestos se evaluaron cuantitativamente mediante el índice de combinación de Chou & Talalay mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de combinación} = \frac{a}{A} + \frac{b}{B}$$

donde a y b son las CI_{50} de los compuestos combinados, y A y B las CI_{50} de los compuestos individualmente.

4. Resultados

4.1. Evaluación del efecto individual de las micotoxinas en la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y

En primer lugar, para poner a punto el experimento de MTT y estimar la densidad celular necesaria, así como el tiempo de incubación, se comenzó realizando este ensayo de viabilidad sobre la línea celular SH-SY5Y utilizando saponina. La saponina es un compuesto tóxico que produce micelas en las membranas celulares y ha sido ampliamente utilizado como inductor de

muerte (Wu & Yang, 2004). Las células se trataron con saponina a concentraciones entre 0,001 y 1 mg/mL durante 24 horas y su efecto sobre la viabilidad celular se analizó con el ensayo MTT (Figura 9).

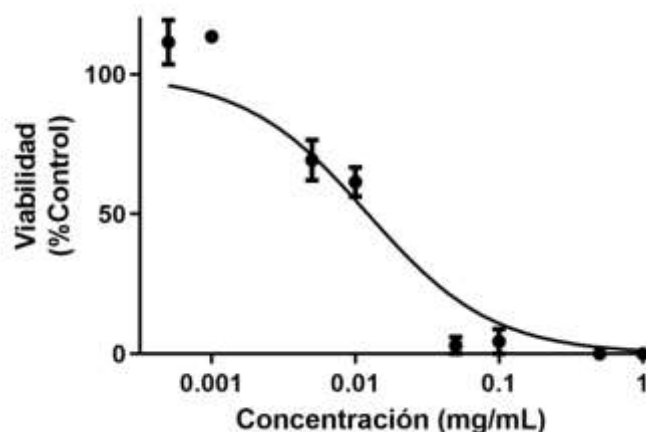


Figura 9. Curva dosis-respuesta del efecto de la saponina sobre la viabilidad de la línea SH-SY5Y de neuroblastoma. Las células se trataron durante 24 horas con este compuesto a concentraciones entre 0,001 y 1 mg/mL. Los datos se expresan en porcentaje de las células control y representan la media \pm SEM de tres experimentos independientes

En la gráfica se observa que a partir de concentraciones próximas o superiores a 0,1 mg/mL, la supervivencia celular es nula. Al realizar el ajuste con el modelo log(inhibidor) vs respuesta se obtuvo una CI_{50} de 0,012 mg/mL con un intervalo de confianza (IC) al 95 % entre 0,0057 y 0,026 mg/mL. En vista de estos resultados, se seleccionó la concentración de 1 mg/mL, que reduce totalmente la viabilidad celular, para utilizar como control de muerte en los siguientes ensayos. Además, se confirmó que tanto la densidad de las células como el tiempo de incubación escogidos eran adecuados para analizar el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular.

Tras la puesta a punto del ensayo con saponina, continuamos usando el MTT para analizar el efecto de las toxinas DON y AF sobre la viabilidad de las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. Para ello, las células se trataron durante 24 horas con ambos compuestos a concentraciones entre 0,1 y 10 μ M para el DON y 0,1 y 100 μ M para el AF (Figura 10).

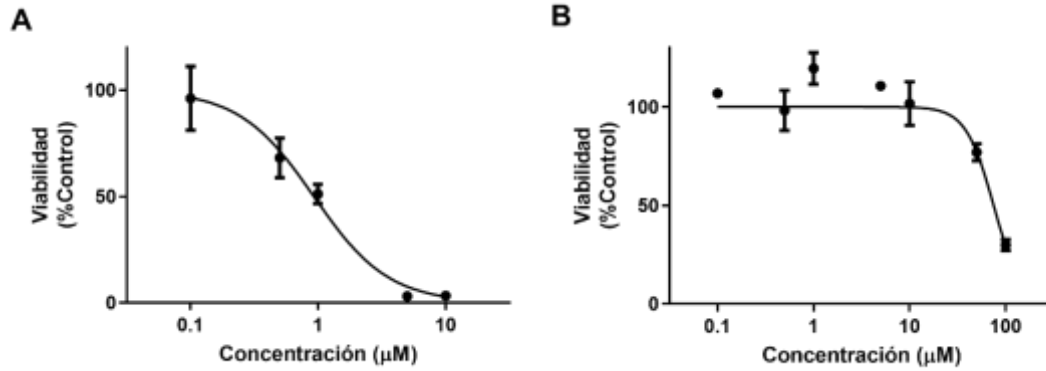


Figura 10. Curvas dosis-respuesta del efecto del DON (A) y el AF (B) sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y. Las células se trataron durante 24 horas con las micotoxinas y se analizó la viabilidad mediante el ensayo MTT. Los datos están expresados en porcentaje del control y representan la media \pm SEM de tres réplicas independientes

Se observa que tratando las células con DON a una concentración de 10 μ M se consigue la disminución total de la viabilidad, mientras que el AF necesita una concentración mucho mayor para conseguir esa reducción. De hecho, utilizando una concentración de AF 100 μ M se alcanzó una disminución del $70,1 \pm 2,9$ % de la supervivencia celular, sin conseguir reducirla al 100%.

Con los datos obtenidos se calculó la CI_{50} para cada toxina, obteniendo los valores recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2. CI_{50} individual de las toxinas en la línea SH-SY5Y obtenidos mediante el ensayo MTT tras 24 horas de incubación. Los datos se presentan con el IC al 95% y el coeficiente de determinación del ajuste (R^2)

Toxina	CI_{50} (μ M)	IC 95% (μ M)	R^2
DON	0,93	0,71-1,20	0,99
AF	75,02	60,09-94,91	0,78

Se obtuvo una CI_{50} de 0,93 μ M para el DON frente a la CI_{50} de 75,02 del AF. Estos resultados dejan clara la diferente toxicidad que generan estos compuestos por separado en esta línea celular, siendo el DON unas 75 veces más tóxico que el AF.

Tras el cálculo de la CI_{50} de ambos compuestos, el siguiente paso fue determinar el tipo de muerte que producen las micotoxinas sobre la línea celular utilizada durante este estudio. Para ello se utilizó la doble tinción con Anexina V-FITC y IP. Gracias a la citometría de flujo y a estas tinciones podemos cuantificar el tipo de muerte que sufren las células tratadas con las micotoxinas. En el citómetro podemos observar que la Anexina V-FITC (marcador de

apoptosis) emite fluorescencia a 520 nm (canal 2) y el IP (marcador de necrosis) emite a 620 nm (canal 5) (Figura 11). Por tanto, esta tinción permite diferenciar el porcentaje de células vivas (Figura 11A), células en apoptosis temprana y apoptosis tardía (Figura 11B-C) y células en necrosis (Figura 11D).

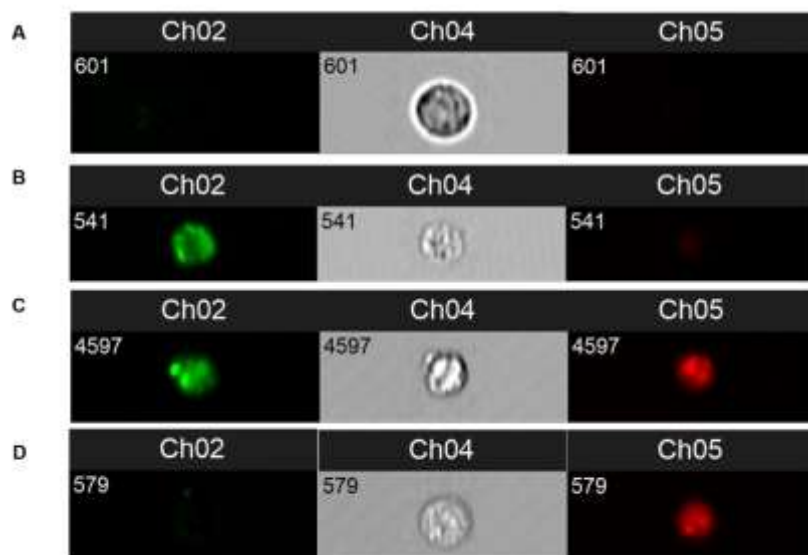


Figura 11. Imágenes representativas de las células SH-SY5Y marcadas con AnexinaV-FITC e IP, obtenidas mediante citometría de flujo. Las imágenes corresponden a células tratadas con el control de apoptosis, STS a 0,05 μ M, durante 24 horas. En el canal 2 observamos la fluorescencia verde (520 nm) de la Anexina V-FITC, marcador de apoptosis, y en el canal 5 la fluorescencia roja (620nm) del IP, marcador de necrosis. Distinguimos así células vivas sin ninguna tinción (A), células en apoptosis temprana, positivas en Anexina V-FITC y negativas en IP (B), células en apoptosis tardía, positivas en Anexina V-FITC positivo e IP (C), y células en necrosis, negativas en Anexina V-FITC y positivas en IP (D)

Para el análisis del tipo de muerte, las células se trataron con DON y AF a las CI_{50} obtenidas con el ensayo MTT. Para este ensayo se utilizó la STS a 0,05 μ M como control de muerte o inductor de apoptosis. Tras 24 horas de incubación con los compuestos, se tiñeron las células con Anexina V-FITC y IP siguiendo las instrucciones del kit de detección de apoptosis anteriormente descrito. Posteriormente, la fluorescencia de 10000 eventos fue analizada mediante citometría de flujo (Figura 12).

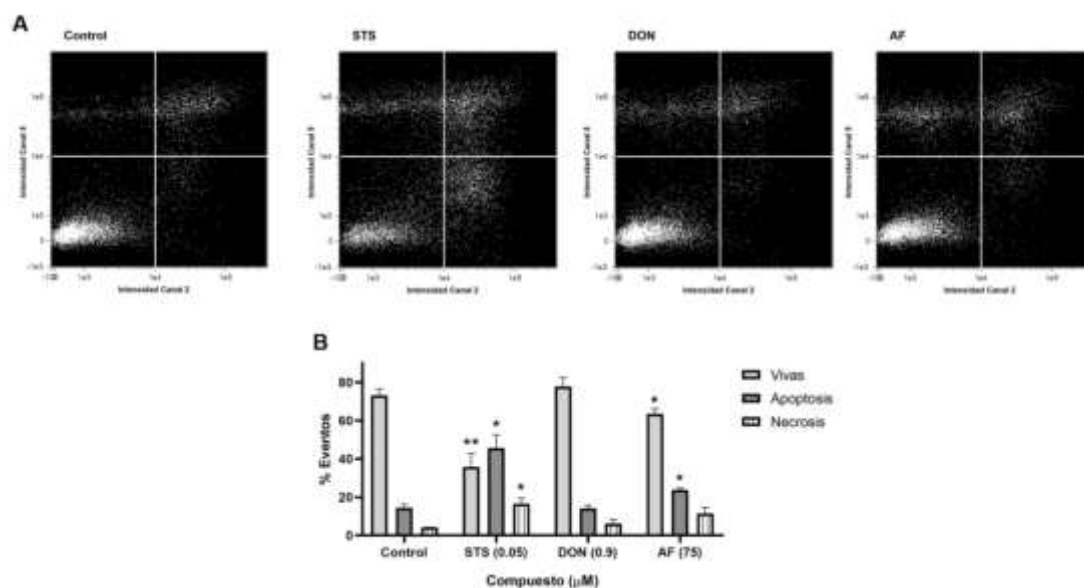


Figura 12. Análisis y cuantificación del tipo de muerte celular producida por las micotoxinas DON y AF sobre la línea celular SH-SY5Y mediante citometría de flujo. Las células fueron tratadas con la CI_{50} de las micotoxinas y cultivadas durante 24 horas para después añadirles las tinciones de Anexina V-FITC e IP. La STS se usó como control de muerte y la fluorescencia obtenida fue analizada mediante citometría de flujo. (A) Gráfico de dispersión representativo para cada tratamiento. El eje Y representa la fluorescencia producida por el IP y el eje X representa la fluorescencia de la Anexina V-FITC. (B) Gráfico de barras del tipo de muerte celular inducido por las micotoxinas y el STS. Los datos están expresados como porcentaje del total de eventos analizados. Se calculó el porcentaje de células vivas (Anexina V-FITC -/IP -), de células en apoptosis (Anexina V-FITC +/ IP + o -), y de células en necrosis (Anexina V-FITC -/ IP +). Son la media \pm SEM de tres experimentos independientes, comparados con las células del control de vida mediante la prueba t de Student. Se consideraron las diferencias estadísticamente significativas cuando * $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$

Como era de esperar, la STS a una concentración de $0,05 \mu\text{M}$ produjo una reducción significativa en el porcentaje de células vivas, con una supervivencia del $35,73 \pm 7,27 \%$, ($p < 0,01$) (Figura 12B). Este descenso se debe a un porcentaje de las células en apoptosis del $45,70 \pm 6,95 \%$, así como a un incremento del $16,55 \pm 2,94\%$ en la necrosis, ambos resultados significativos ($p < 0,05$) al compararlos con las células del control. Por otro lado, el DON no produjo ningún aumento significativo en la muerte de las células a la concentración empleada en comparación al control. El tratamiento con esta micotoxina regulada genera un $14,09 \pm 1,81 \%$ de apoptosis y un porcentaje del $6,12 \pm 2,14 \%$ de necrosis. En cambio, el AF, la micotoxina no regulada, produce descenso significativo en las células vivas en comparación con el control ($63,57 \pm 2,77 \%$, $p < 0,05$). Al analizar el tipo de muerte producido por esta micotoxina, se observa que genera un $23,71 \pm 1,03\%$ de apoptosis, lo que resulta significativo frente al control

($p < 0,05$), y un $11,33 \pm 3,33$ % de necrosis, que no es estadísticamente significativo. Por tanto, la disminución en las células vivas producida por el AF se debe a la activación de la apoptosis.

4.2. Evaluación del efecto combinado de las micotoxinas sobre la viabilidad celular de la línea SH-SY5Y

Con el fin de simular la presencia en la naturaleza de estos compuestos comúnmente encontrados juntos en los cereales, se combinaron ambas toxinas para evaluar su toxicidad conjunta *in vitro*. Se utilizó una proporción 2:1 de DON y AF dado que es la ratio que se encuentra en las muestras naturales contaminadas (González-Jartín et al., manuscrito en preparación). Las células se trataron durante 24 horas con DON en un rango de concentraciones entre 0,1 y 10 μM , y con AF entre 0,05 y 5 μM (Figura 13).

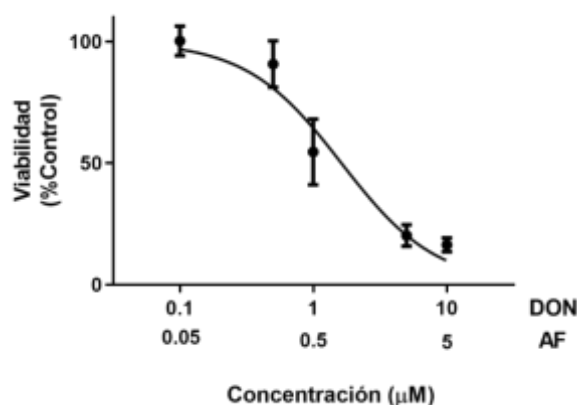


Figura 13. Curva dosis-respuesta resultante del efecto de la combinación del DON y AF en una proporción 2:1. Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y se trataron con las toxinas en combinación a concentraciones entre 0,1 y 10 μM para el DON y 0,05 y 5 μM para el AF. Tras 24 horas de incubación, se analizó su efecto sobre la viabilidad celular con el ensayo MTT. Los datos son la media \pm SEM de tres réplicas independientes, expresados como porcentaje de las células control

Se observa que el efecto sobre la viabilidad producido por ambas toxinas en proporción 2:1 es muy similar al generado por el DON individualmente, con una disminución en la actividad metabólica de las células a partir de la dosis de 0,5 μM de DON y de 0,25 μM de AF.

A partir de la curva dosis-respuesta obtenida con los resultados del ensayo MTT, se calcularon las CI_{50} de las micotoxinas combinadas (Tabla 3).

Tabla 3. CI_{50} de las toxinas en combinación a una proporción 2:1 tras 24 horas de incubación. Los datos se presentan con el IC al 95% y el coeficiente de determinación del ajuste (R^2)

Toxina	CI_{50} (μM)	IC 95% (μM)	R^2
DON	1,62	1,03-2,61	0,86
AF	0,81	0,52-1,30	0,86

Con estos resultados podemos prever que el efecto causado por la combinación de las toxinas es debido al DON casi en su totalidad, puesto que el valor de su CI_{50} en combinación con el AF es muy similar al obtenido con la toxina sola, mientras que la CI_{50} del AF en combinación es mucho más baja.

Con los datos de las CI_{50} de los compuestos por separado y combinados, se calculó el índice de combinación mediante el método de Chou & Talalay (Chou & Talalay, 1984). Recordamos que, si este índice resulta mayor a 1, indica que ambos compuestos son antagonistas entre sí, si es igual a 1, indica su efecto aditivo, y si el valor resultante es menor a 1, indica que las micotoxinas tienen efecto sinérgico. Los resultados de este índice, así como de los datos de CI_{50} a partir de los cuales se ha calculado, se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Índice de combinación de las micotoxinas en proporción 2:1 tras 24 horas de incubación. El índice de combinación fue calculado mediante el método de Chou & Talalay (Chou & Talalay, 1984)

Toxina	CI_{50} individual (μM)	CI_{50} mezcla 2:1 (μM)	Índice de combinación
DON	0,93	1,62	1,75
AF	75,02	0,81	

5. Discusión

La presencia de micotoxinas en los alimentos es una cuestión preocupante para la salud humana y animal, puesto que se ha asociado a problemas tanto de toxicidad aguda como crónica, con efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos, y afecta a distintos órganos, dando lugar a nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, etc (Kifer et al., 2020). Cuando una o más

micotoxinas aparecen conjuntamente contaminando a un alimento, estos efectos pueden verse potenciados o disminuidos dependiendo de si los compuestos tienen acción aditiva, sinérgica o antagonista entre sí, lo que nos lleva a la importancia de este estudio (Speijers & Speijers, 2004).

Esta presencia de más de una micotoxina en la naturaleza es algo que ocurre con frecuencia debido a la capacidad de la mayoría de los hongos para producir simultáneamente diferentes micotoxinas. El aumento de esta co-ocurrencia está favorecido a su vez por factores como el cambio climático, ya que el incremento de las temperaturas a nivel global crea las condiciones propicias para el crecimiento de diferentes especies de hongos (Juan-García et al., 2019). Por tanto, no es de extrañar que muchos alimentos, especialmente cereales, se encuentren contaminados al mismo tiempo por DON y AF, ambas toxinas producidas por especies del género *Fusarium* (Blandino et al., 2015; Weaver et al., 2021).

Sin embargo, a pesar del aumento en su ocurrencia y de las implicaciones en la salud pública y animal, existen muy pocos estudios sobre la toxicidad generada por la contaminación conjunta de varias micotoxinas, y por tanto se desconocen los efectos de su presencia simultánea en la toxicidad de los alimentos. De hecho, en el caso de las micotoxinas emergentes, no existen límites máximos legales debido a la falta de información sobre su toxicidad (EFSA, 2014; Speijers & Speijers, 2004).

Con el fin de aportar más datos sobre la toxicidad de las micotoxinas DON y AF, en este estudio se ha trabajado sobre la línea celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y para comprobar los efectos neurotóxicos de estos compuestos. Es de especial interés el estudio de la neurotoxicidad del AF, puesto que actualmente apenas hay trabajos publicados sobre esta toxina no regulada y su efecto neurotóxico (Berthiller et al., 2013).

En primer lugar, se analizó el efecto individual de estas micotoxinas sobre la viabilidad celular, con un ensayo que evalúa el funcionamiento de las mitocondrias. Para ello, se calculó la CI_{50} de ambas toxinas, concluyéndose que la micotoxina regulada DON es la que produce un mayor daño celular, con una CI_{50} de 0,93 μ M. Estos resultados coinciden con otros estudios publicados previamente, en los que la CI_{50} de esta misma micotoxina tiene un valor similar (0,94 μ M) en la misma línea celular (Pérez-Fuentes et al., 2021).

Por otro lado, se obtuvo una CI_{50} de 75,02 μ M para el AF, micotoxina emergente y por tanto no regulada, sobre la que encontramos mucha menos información acerca de su efecto individual y combinado. A pesar de que este es el primer estudio que se realiza con esta micotoxina sobre células neuronales, existen trabajos en los que se tratan con AF otro tipo de células y con los que podemos contrastar cierta información. Por ejemplo, al igual que ocurre en el presente trabajo, el AF también produce apoptosis sobre células humanas de carcinoma

epitelial de esófago (Devnarain et al., 2017). Otras publicaciones que respaldan el efecto apoptótico del AF se han realizado sobre la línea celular de hepatocitos humanos HepG2 y células hepáticas de ratones (Ghazi et al., 2020; Sheik Abdul et al., 2016).

Con el fin de aumentar el conocimiento sobre el mecanismo de acción del AF, y dada la escasa cantidad de estudios que han sido publicados sobre su toxicidad, sería interesante realizar más ensayos para evaluar su efecto tóxico sobre otro tipo de células, y ampliar estos trabajos para demostrar si la apoptosis que produce esta micotoxina es extrínseca o intrínseca, mediante el análisis de su efecto sobre la actividad y la expresión de las caspasas, así como de otras proteínas implicadas en estas rutas intracelulares.

Con respecto al DON, cuando analizamos la integridad de la membrana plasmática y el tipo de muerte celular mediante citometría de flujo, encontramos que esta micotoxina no muestra efectos citotóxicos sobre las células de neuroblastoma humano. Para entender estos resultados debemos tener en cuenta que el ensayo MTT, mediante el cual hemos calculado la CI_{50} , se basa en el funcionamiento mitocondrial (Kupcsik, 2011), por lo que permite analizar el metabolismo y la proliferación celular. Por otro lado, con la tinción de Anexina V-FITC e IP evaluamos la integridad de la membrana y permite discernir entre muerte celular por apoptosis o necrosis (Crowley et al., 2016). Por tanto, en vista de los resultados obtenidos, la mitocondria parece estar afectada por el DON, pero la integridad de la membrana plasmática no se ve comprometida a la concentración usada. Estos resultados coinciden con otro estudio en el que se evaluó el potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con DON, en el que se observó que la cadena de transporte electrónico de las células SH-SY5Y no funcionaba correctamente, y por tanto las mitocondrias estaban dañadas. Sin embargo, al analizar los niveles de lactato deshidrogenasa, enzima citosólica que se libera al medio cuando se rompe la membrana plasmática de la célula, no se observó un aumento de la misma hasta concentraciones de 10 μ M, por lo que la membrana plasmática sigue intacta (Pérez-Fuentes et al., 2021).

A pesar de que en la línea celular utilizada en el presente trabajo el DON no produce apoptosis, diversos estudios avalan la capacidad de esta micotoxina de producir este tipo de muerte en otras células, como en la línea de adenocarcinoma de colon humano HCT116/HT-29, o en la línea de eritroleucemia humana K562. No obstante, encontramos claras diferencias entre dichos estudios y el presente trabajo, pues además de tratarse de otros tipos celulares, se usó una concentración de DON mucho mayor que la utilizada en este trabajo (80 y 100 μ M, respectivamente) (Bensassi et al., 2012; Krishnaswamy et al., 2010; Minervini et al., 2004).

Una hipótesis que podría explicar nuestros resultados es que las células neuronales sufren un proceso de mitofagia o autofagia mitocondrial al ser expuestas a esta micotoxina, ya que se observa una disminución de la actividad mitocondrial pero la integridad celular no está afectada (Zhu et al., 2021). Esta teoría puede apoyarse con diversos estudios en los que se comprueba

que el DON causa autofagia en diferentes líneas celulares (Guo et al., 2019; Liao et al., 2020; Ren et al., 2020). La mitocondria tiene un papel fundamental en la fosforilación oxidativa, la oxidación de ácidos grasos, y en la regulación de la muerte celular. Sin embargo, también es la principal responsable de producir especies reactivas de oxígeno, que producen daño en el ADN mitocondrial, proteínas y lípidos, lo que a su vez hace que estos orgánulos secreten más moléculas dañinas. Para paliar este daño oxidativo, las mitocondrias poseen un control intrínseco sobre su propio funcionamiento, y cuando el estrés oxidativo supera la capacidad del sistema de control mitocondrial, la llamada mitofagia degrada las mitocondrias dañadas para mantener la homeostasis celular (Hirota et al., 2012).

Concluimos el estudio calculando el índice de combinación de ambas toxinas mediante el método de Chou & Talalay, obteniéndose que la mezcla de estas micotoxinas produce un efecto antagonista. Por tanto, los alimentos contaminados simultáneamente con DON y AF no tendrán una toxicidad superior a aquellos que estén contaminados con las toxinas individualmente. No es de extrañar el resultado antagónico de esta combinación, ya que por definición, el efecto antagonista entre dos compuestos suele darse entre moléculas con distintos mecanismos de acción (Jaramillo, 2006). Así, el AF produciendo apoptosis y el DON generando posiblemente mitofagia, actúan mediante diferentes mecanismos de acción, lo que explicaría su efecto antagonista.

6. Conclusiones

1. El DON presenta una CI_{50} de 0,93 μM en la viabilidad celular de la línea de neuroblastoma humano SH-SY5Y.
2. El AF solo produce efectos sobre la viabilidad de las células SH-SY5Y a concentraciones superiores a 50 μM , mostrando una CI_{50} de 75,02 μM .
3. El AF induce apoptosis en la línea celular SH-SY5Y, mientras que el DON no genera apoptosis ni necrosis en dichas células.
4. La combinación 2:1 de DON y AF produce efectos antagónicos sobre las células SH-SY5Y, por lo que la contaminación simultánea con estas micotoxinas no incrementa la toxicidad.

7. Bibliografía

- Adeyeye, S. A. O. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2, 1213127. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>
- AESAN. (2021). Deoxinivalenol. Informe de la reunión del grupo de trabajo sobre cuestiones agrícolas (productos fitosanitarios).
- Alvariño Romero, R. (2019). Evaluation of natural compounds activity against oxidative stress and neuroinflammation. Implications for Alzheimer's disease. Universidade de Santiago de Compostela. <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/23684>
- Arroyo-Manzanares, N., Rodríguez-Estévez, V., Arenas-Fernández, P., García-Campaña, A. M., & Gámiz-Gracia, L. (2019). Occurrence of Mycotoxins in Swine Feeding from Spain. *Toxins (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/toxins11060342>
- Ashton, J. C. (2015). Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou–Talalay Method—Letter. *Cancer Research*, 75(11). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3763>
- Bacon, C. W., Porter, J. K., Norred, W. P., & Leslie, J. F. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol*, 62(11), 4039-4043. <https://doi.org/10.1128/aem.62.11.4039-4043.1996>
- Bensassi, F., Gallerne, C., Sharaf El Dein, O., Lemaire, C., Hajlaoui, M. R., & Bacha, H. (2012). Involvement of mitochondria-mediated apoptosis in deoxynivalenol cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*, 50(5), 1680-1689. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.015>
- Berthiller, F., Crews, C., Dall'Asta, C., Saeger, S. D., Haesaert, G., Karlovsky, P., Stroka, J. (2013). Masked mycotoxins: a review. *Mol Nutr Food Res*, 57(1), 165-186. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201100764>
- Blandino, M., Scarpino, V., Vanara, F., Sulyok, M., Krska, R., & Reyneri, A. (2015). Role of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) on contamination of maize with 13 *Fusarium* mycotoxins. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 32(4), 533-543. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.966158>
- Bonnet, M. S., Roux, J., Mounien, L., Dallaporta, M., & Troadec, J. D. (2012). Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: the brain as a target. *Toxins (Basel)*, 4(11), 1120-1138. <https://doi.org/10.3390/toxins4111120>
- Chou, T.-C. (2010). Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou–Talalay Method. *Cancer Research*, 70(2). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>
- Chou, T. C., & Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 22, 27-55. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(84\)90007-4](https://doi.org/10.1016/0065-2571(84)90007-4)
- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., & Waterhouse, N. J. (2016). Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016(11). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087288>
- Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ*, 26(4), 605-616. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>
- Devnarain, N., Tiloke, C., Nagiah, S., & Chuturgoon, A. A. (2017). Fusaric acid induces oxidative stress and apoptosis in human cancerous oesophageal SNO cells. *Toxicon*, 126, 4-11. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.12.006>
- Dhani, S., Ghazi, T., Nagiah, S., Baijnath, S., Singh, S. D., & Chuturgoon, A. A. (2020). Fusaric acid alters Akt and ampk signalling in c57bl/6 mice brain tissue. *Food Chem Toxicol*, 138, 111252. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111252>
- EFSA. (2014). Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA Journal*, 12(8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3802>

- Fernández Araujo, A. (2015). Mecanismo de acción de las toxinas marinas: rutas intracelulares implicadas y su aplicación en métodos de detección. Universidad de Santiago de Compostela. <http://hdl.handle.net/10347/12073>
- Ghazi, T., Nagiah, S., Dhani, S., & Chuturgoon, A. A. (2020). Fusaric acid-induced epigenetic modulation of hepatic H3K9me3 triggers apoptosis. *Epigenomics*, 12(11), 955-972. <https://doi.org/10.2217/epi-2019-0284>
- Grant, R. (2014). *MTT reaction* [Mitochondrial reduction of MTT to blue formazan product]. Wikimedia Commons. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MTT_reaction.png
- Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., & Berthiller, F. (2017). Emerging Mycotoxins: Beyond Traditionally Determined Food Contaminants. *J Agric Food Chem*, 65(33), 7052-7070. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b03413>
- Guo, W., Gu, X., Tong, Y., Wang, X., Wu, J., & Chang, C. (2019). Protective effects of mannan/ β -glucans from yeast cell wall on the deoxynivalenol-induced oxidative stress and autophagy in IPEC-J2 cells. *Int J Biol Macromol*, 135, 619-629. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.180>
- Hirota, Y., Kang, D., & Kanki, T. (2012). The Physiological Role of Mitophagy: New Insights into Phosphorylation Events. *International Journal of Cell Biology*, 2012. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2012/354914>
- Jaramillo, M. V. M. (2006). Aditividad, Sinergismo y Antagonismo entre Micotoxinas y sus Efectos en Pollos de Engorde. *Engormix*.
- John W Baynes, M. H. D. (2019). Muerte celular: apoptosis, necrosis y autofagia. In Elsevier (Ed.), *Bioquímica médica* (Vol. 5, pp. 404-413).
- Juan-García, A., Tolosa, J., Juan, C., & Ruiz, M. J. (2019). Cytotoxicity, Genotoxicity and Disturbance of Cell Cycle in HepG2 Cells Exposed to OTA and BEA: Single and Combined Actions. *Toxins (Basel)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/toxins11060341>
- Kifer, D., Jakšić, D., & Klarić, M. Š. (2020). Assessing the Effect of Mycotoxin Combinations: Which Mathematical Model Is (the Most) Appropriate?. *Toxins*, 12(3), 153. <https://doi.org/10.3390/toxins12030153>
- Krishnaswamy, R., Devaraj, S. N., & Padma, V. V. (2010). Lutein protects HT-29 cells against Deoxynivalenol-induced oxidative stress and apoptosis: prevention of NF-kappaB nuclear localization and down regulation of NF-kappaB and Cyclo-Oxygenase-2 expression. *Free Radic Biol Med*, 49(1), 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.016>
- Kupcsik, L. (2011). Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol Biol*, 740, 13-19. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_3
- Liao, S., Tang, S., Tan, B., Li, J., Qi, M., Cui, Z., Tang, Y. (2020). Chloroquine Improves Deoxynivalenol-Induced Inflammatory Response and Intestinal Mucosal Damage in Piglets. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 9834813. <https://doi.org/10.1155/2020/9834813>
- Liu, C., & Van der Fels-Klerx, H. J. (2021). Quantitative Modeling of Climate Change Impacts on Mycotoxins in Cereals: A Review. *Toxins (Basel)*, 13(4). <https://doi.org/10.3390/toxins13040276>
- Mamur, S., Ünal, F., Yılmaz, S., Erikel, E., & Yüzbaşıoğlu, D. (2020). Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of mycotoxin fusaric acid. *Drug Chem Toxicol*, 43(2), 149-157. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1499772>
- MAPA. (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas.
- Martínez Salazar, M. (2009). Técnicas para la detección de apoptosis y senescencia celular in vitro y su importancia en biotecnología de la salud. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11, 152-166.
- Medina, Á., Akbar, A., Baazeem, A., Rodríguez, A., & Magan, N. (2017). Climate change, food security and mycotoxins: Do we know enough? *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 143-154. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.04.002>

- Minervini, F., Fornelli, F., & Flynn, K. M. (2004). Toxicity and apoptosis induced by the mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and fumonisin B1 in a human erythroleukemia cell line. *Toxicol In Vitro*, 18(1), 21-28. [https://doi.org/10.1016/s0887-2333\(03\)00130-9](https://doi.org/10.1016/s0887-2333(03)00130-9)
- Murrow, L., & Debnath, J. (2013). Autophagy as a stress-response and quality-control mechanism: implications for cell injury and human disease. *Annu Rev Pathol*, 8, 105-137. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163918>
- Ouyang, L., Shi, Z., Zhao, S., Wang, F. T., Zhou, T. T., Liu, B., & Bao, J. K. (2012). Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Prolif*, 45(6), 487-498. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x>
- Pestka, J. J. (2010). Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Arch Toxicol*, 84(9), 663-679. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0579-8>
- Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., & Lavrik, I. N. (2015). Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining. *J Immunol Methods*, 423, 99-103. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.025>
- Pérez-Fuentes, N., Alvariño, R., Alfonso, A., González-Jartín, J., Gegunde, S., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2021). Single and combined effects of regulated and emerging mycotoxins on viability and mitochondrial function of SH-SY5Y cells. *Food Chem Toxicol*, 154, 112308. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112308>
- Ramanpreet, W., Madaan, R., Chaudhary, K., Mehta, B., & Bala, R. (2021). Molecular pathways of apoptotic cell death. In Elsevier (Ed.), *Clinical Perspectives and Targeted Therapies in Apoptosis* (pp. 79-109). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815762-6.00003-2>
- Ramírez Agudelo, M. E., & Rojas López, M. (2010). La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia*, 23.
- Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., & Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Ann N Y Acad Sci*, 1312, 105-112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>
- Ren, Z., Guo, C., He, H., Zuo, Z., Hu, Y., Yu, S., Deng, J. (2020). Effects of deoxynivalenol on mitochondrial dynamics and autophagy in pig spleen lymphocytes. *Food Chem Toxicol*, 140, 111357. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111357>
- Romera, D., Mateo, E. M., Mateo-Castro, R., Gómez, J. V., Gimeno-Adelantado, J. V., & Jiménez, M. (2018). Determination of multiple mycotoxins in feedstuffs by combined use of UPLC-MS/MS and UPLC-QTOF-MS. *Food Chem*, 267, 140-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.040>
- Rouco, L., Sánchez-González, Á., Alvariño, R., Alfonso, A., Vázquez-López, E. M., García-Martínez, E., & Maneiro, M. (2020). Combined Effect of Caspase-Dependent and Caspase-Independent Apoptosis in the Anticancer Activity of Gold Complexes with Phosphine and Benzimidazole Derivatives. *Pharmaceuticals (Basel)*, 14(1). <https://doi.org/10.3390/ph14010010>
- Sainz, M. J., González-Jartín, J. M., Aguín, O., Mansilla, J. P., & Botana, L. M. (2018). Isolation, characterization, and identification of mycotoxin-producing fungi. In L. M. Botana (Ed.), *Environmental toxicology* (pp. 202-245). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/9783110442045-008>
- Seyedmousavi, S., Bosco, S. M. G., de Hoog, S., Ebel, F., Elad, D., Gomes, R. R., Guillot, J. (2018). Fungal infections in animals: a patchwork of different situations. *Med Mycol*, 56, 165-187. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx104>
- Sheik Abdul, N., Nagiah, S., & Chuturgoon, A. A. (2016). Fusaric acid induces mitochondrial stress in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Toxicon*, 119, 336-344. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.07.002>
- Speijers, G. J., & Speijers, M. H. (2004). Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol Lett*, 153(1), 91-98. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.046>

- Stoddart, M. J. (2011). Cell viability assays: introduction. *Methods Mol Biol*, 740, 1-6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I., & Schatzmayr, G. (2013). Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *J Sci Food Agric*, 93(12), 2892-2899. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6225>
- Streit, E., Schatzmayr, G., Tassis, P., Tzika, E., Marin, D., Taranu, I., Oswald, I. P. (2012). Current situation of mycotoxin contamination and co-occurrence in animal feed--focus on Europe. *Toxins (Basel)*, 4(10), 788-809. <https://doi.org/10.3390/toxins4100788>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*, 731, 237-245. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20
- Weaver, A. C., Weaver, D. M., Adams, N., & Yiannikouris, A. (2021). Co-Occurrence of 35 Mycotoxins: A Seven-Year Survey of Corn Grain and Corn Silage in the United States. *Toxins (Basel)*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/toxins13080516>
- Wu, C. A., & Yang, Y. W. (2004). Induction of cell death by saponin and antigen delivery. *Pharm Res*, 21(2), 271-277. <https://doi.org/10.1023/b:pham.0000016239.04067.66>
- Zhang, J., You, L., Wu, W., Wang, X., Chrienova, Z., Nepovimova, E., Kuca, K. (2020). The neurotoxicity of trichothecenes T-2 toxin and deoxynivalenol (DON): Current status and future perspectives. *Food Chem Toxicol*, 145, 111676. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111676>
- Zhu, C. L., Yao, R. Q., Li, L. X., Li, P., Xie, J., Wang, J. F., & Deng, X. M. (2021). Mechanism of Mitophagy and Its Role in Sepsis Induced Organ Dysfunction: A Review. *Front Cell Dev Biol*, 9, 664896. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.664896>