

## EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE AFLATOXINA B<sub>1</sub> Y FUMONISINA B<sub>1</sub> EN CÉLULAS INTESTINALES PORCINAS

\*Moreno.RC.<sup>1</sup>; Moreno ME<sup>1</sup>, Tortora, J<sup>1</sup>, Ciprian CA.<sup>1</sup>; Pinton P<sup>2</sup>; Mendoza ES.<sup>1</sup> Oswald I<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM. Av. 1° de Mayo s/n. Col. Atlanta, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México;

<sup>2</sup>INRA-TOULOUSE, FRANCIA <sup>2</sup>Pharmacology and Toxicology Laboratory, UR 66, National Institute of Agronomic Research INRA, Toulouse, France.

### Introducción

Las especies de hongos como *Fusarium* y *Aspergillus* productores de micotoxinas, pueden estar presentes en cereales utilizados para la alimentación humana y animal, por lo tanto los alimentos están expuestos a la presencia de más de una micotoxina. La combinación de diversas micotoxinas pueden mostrar un efecto antagonico, aditivo o bien sinérgico sobre el tracto gastrointestinal ocasionando que las células epiteliales intestinales alteren la integridad y su metabolismo (1,2).

### Materiales y Métodos

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Investigación Agronómica en Toulouse, Francia. Donde se utilizó una línea de células intestinales porcinas IPEC-Italie, para determinar el efecto de Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) y Fumonisinas B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) en la proliferación y en la integridad epitelial, a través de las pruebas de viabilidad celular (MTS), liberación de lactodeshidrogenasa (LDH) y producción de interleucina 8 (IL-8). Se utilizó la línea celular denominada IPEC-Italie, correspondiente a células de epitelio intestinal porcino recién nacido, no amamantado. Ésta línea celular fue obtenida del "INRA". Unidad de Farmacología-Toxicología, Toulouse Francia. Para su crecimiento se utilizó medio modificado Dulbecco's Eagle's completo, suplementado con antibióticos (penicilina 50 µg/ml y estreptomina 4 µg/ml), suero fetal bovino 10%, L-glutamina a 2 mM HEPES, Factor de crecimiento epidérmico (5 µg/ml y ITS: insulina (5 µg/ml), transferina (5 µg/ml) y selenio (5 ng/ml). La Fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) purificada fue obtenida de Promec (Tygerberg, South Africa), presentación de 10.9 mg, con un peso molecular de 721.8 g (C<sub>34</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>15</sub>), fue diluida en agua destilada para preparar las soluciones de almacenamiento y posteriormente diluida en el medio de cultivo a la concentración requerida (0, 3.7, 5, 10, 20, 50, 100 y 500 µM). La Aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) purificada se obtuvo de Alexis Biochemical (San Diego, USA), presentación de 5 mg, con un peso molecular de 312.3 g (C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>). Se utilizó Etanol para preparar la solución de almacén a una concentración 10 mM, consecutivamente se diluyó en medio de cultivo a la concentración requerida (0, 1.3, 2, 5, 10, 50 y 100 µM). Combinación de AFB<sub>1</sub>/FB<sub>1</sub> se diluyó en medio de cultivo a la concentración requerida (0/0, 1.3/3.7, 2/3.7 y 5/10 µM). Las células se sembraron en una placa de 24 pozos (2cm<sup>2</sup> de área por pozo) a razón de 300,000 células (3X10<sup>5</sup>) por pozo en un 1 ml de DMEM completo. Una vez que las células fueron confluyentes (48 hrs) se adicionó AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub>, y la combinación de AFB<sub>1</sub>/FB<sub>1</sub>. El efecto de AFB<sub>1</sub>, FB<sub>1</sub> y su combinación (AFB<sub>1</sub>/FB<sub>1</sub>) sobre la viabilidad células IPEC-Italie fueron estudiadas a través de un método colorimétrico usando el un kit CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay PROMEGA. Se llevo a cabo la determinación de IL-8 producida en el cultivo celular por la técnica de ELISA, utilizando un kit

Porcine IL-8 PROMEGA. Para la determinación de IL-8 ésta se evaluó a las 24 y 48hrs posdesafío. Para la determinación de LDH se utilizó el kit CyTox 96 Non-Radiative Cytotoxicity Assay PROMEGA, y una placa de 96 pozos estándar. Se midió cuantitativamente la Lactato deshidrogenasa (LDH) liberada en el medio de cultivo, 30 min., después la reacción. Se utilizó un diseño completamente al azar. Los datos fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA).

### Resultados

Los resultados obtenidos indican un efecto tóxico sinérgico sobre células diferenciadas y no diferenciadas a concentraciones de 1.3µM AFB<sub>1</sub> / 3.7µM FB<sub>1</sub> y 2µM AFB<sub>1</sub> / 3.7µM FB<sub>1</sub>, en comparación con las mismas concentraciones al administrar una sola micotoxina. Podemos observar que estas concentraciones estimulan la síntesis de IL-8 y de otros mediadores que participan en la respuesta inflamatoria, observándose una disminución severa con la combinación 5µM AFB<sub>1</sub> / 10µM FB<sub>1</sub> (P<0.05), además se favorece el aumento de la permeabilidad y lesión celular, en incremento en la liberación de LDH. La mayor lesión celular se observó con AFB<sub>1</sub> en concentraciones de 50 y 100 µM y con FB<sub>1</sub> en 50, 100 y 500µM. Sin embargo se puede observar un daño significativo (P<0.05) en las combinaciones 1.3µM AFB<sub>1</sub> / 3.7µM FB<sub>1</sub> y 2µM AFB<sub>1</sub> / 3.7µM FB<sub>1</sub>.

### Discusión

Se observo una marcada diferencia en la morfología celular desafiadas con diferentes micotoxinas. Los niveles de IL-8 se presentaron elevados a concentraciones bajas de micotoxinas. La viabilidad celular es afectada a concentraciones altas de micotoxinas. Los niveles de LDH se elevan a concentraciones altas de micotoxinas. La evaluación del efecto de las micotoxinas en líneas celulares fue un adecuado modelo de estudio, el cual aporta datos que pueden ser extrapolados o servir como puntos de referencia con la posible respuesta observada *in vivo*.

### Referencias

1. Bullerman, L. B. (1996). *Adv. Exp. Med. Biol.* 392, 27–38.
2. Shephard, G. S. Et al (1996). *J. A.O.A.C. Int.* 79, 671–687.