



Cuantificación de Zearalenona en el arroz cultivado en Norte de Santander y su efecto citotóxico sobre las células HepG2

Quantification of Zearalenone in rice cultivated in Norte de Santander and its cytotoxic effect on HepG2 cells

Mayra Parada^a; Nancy Jaimes^b; Liliana Rojas^c

a. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Grupo de Investigación en Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN), Km 1 Vía Bucaramanga, Colombia; Mail: mayra.parada@unipamplona.edu.co

b. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Biología, Grupo de Investigación en Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN), Km 1 Vía Bucaramanga, Colombia; Mail: njaimes@unipamplona.edu.co

c. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología, Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO), Km 1 Vía Bucaramanga, Colombia; Mail: lorojas@unipamplona.edu.co

Correspondencia: mayra.parada@unipamplona.edu.co

Recibido: Abril 12, 2023. Aceptado: Mayo 11, 2023. Publicado: Junio 10, 2023

Resumen

La contaminación por micotoxinas en el arroz puede ser considerado un riesgo para la salud de los consumidores. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue cuantificar la concentración de Zearalenona (ZEA) y determinar la presencia de *Fusarium* spp. en arroz de cultivo de 4 municipios de Norte de Santander, así mismo, evaluar el efecto citotóxico de un patrón de ZEA (10 µg/ml), a través del ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difeniltetrazolio (MTT), y la inducción de cambios morfológicos apoptóticos por microscopía electrónica de transmisión en la línea celular HepG2. En los resultados obtenidos se pudo establecer la presencia de ZEA en 3 de las 15 muestras de arroz de cultivo analizadas en concentraciones entre 98 y 490 µg/Kg, de igual manera, se determinó, la presencia de *Fusarium* spp., presuntamente, teniendo en cuenta la caracterización fenotípica de acuerdo a la morfología macroscópica y microscópica, en tres medios de cultivo (PDA, Avena, DG18). Además, los resultados de citotoxicidad indicaron que ZEA causó una disminución notable de la actividad metabólica, y a su vez una reducción significativa en los porcentajes de proliferación celular, de manera dependiente de la concentración y el tiempo de exposición, ya que a partir de 5 µM se obtuvieron valores de 60,88 y 66,02%, a las 48 y 72 horas respectivamente; de igual manera, se evidenció la inducción de cambios morfológicos característicos de la muerte celular por apoptosis.

Abstract

Mycotoxin contamination in rice can be considered a health risk for consumers. Therefore, the objective of this investigation was to quantify the concentration of Zearalenone (ZEA) and determine the presence of *Fusarium* spp. in cultivated rice in 4 municipalities of Norte de Santander, likewise, to evaluate the cytotoxic effect of a pattern of ZEA (10 µg/ml), through the assay of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl bromide)-2, 5-diphenyltetrazolium (MTT), and the induction of apoptotic morphological changes by transmission electron microscopy in the HepG2 cell line. In the results obtained, it was possible to establish the presence of ZEA in 3 of the 15 samples of cultivated rice analyzed in concentrations between 98 and 490 µg/Kg, in the same way, it was determined, the presence of *Fusarium* spp., presumably, taking into account the phenotypic characterization according to macroscopic and microscopic morphology, in three culture media (PDA, Oatmeal, DG18). In addition, the cytotoxicity results indicated that ZEA caused a notable decrease in metabolic activity, and in turn a significant reduction in the percentages of cell proliferation, depending on the concentration and exposure time, since from 5 µM values of 60.88 and 66.02% were obtained, at 48 and 72 hours respectively; similarly, the induction of morphological changes characteristic of cell death by apoptosis was evidenced.

Palabras clave: Apoptosis; Arroz; Citotoxicidad; Zearalenona.

Keywords: Apoptosis ; Rice; Cytotoxicity; Zearalenone

1. Introducción

Zearalenona (ZEA), ácido 6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil) lactona del ácido β-resorcíclico, con fórmula molecular C₁₈H₂₂O₅, es una micotoxina estrogénica no esteroide, metabolito secundario de varias especies de *Fusarium* (*F. graminearum*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. crookwellense* y *F. semitectum*) [1,2]. ZEA es termoestable a temperaturas altas (145-165°C), resistente al procesamiento de alimentos y se puede observar en los productos alimenticios finales [3]. Por lo que, es considerada una preocupación mundial constante,

ya que afecta la seguridad, calidad y las propiedades de alimentos como los granos de arroz [4]. Generalmente, los cereales y derivados, son más susceptibles a la contaminación de manera natural por micotoxinas como ZEA, debido a su almacenamiento inadecuado. La producción de micotoxinas se da especialmente en climas templados y cálidos antes de la cosecha. Su detección en altos niveles, es un problema importante para la seguridad alimentaria y la salud pública [5].

El principal blanco de esta micotoxina es el sistema reproductivo debido a la similitud estructural de ZEA y

algunos de sus metabolitos con las hormonas estrógeno. ZEA se une competitivamente a los receptores de estrógenos y provoca alteraciones en el tracto reproductivo de animales, así mismo, es capaz de inducir lesiones hepáticas con posterior desarrollo de hepatocarcinoma y alteraciones de algunos parámetros enzimáticos de la función hepática. Además, es así como ZEA se considera inmunotóxica, hepatotóxica, nefrotóxica, genotóxica y un potenciador de la peroxidación lipídica [6, 7]. Cuando los animales consumen alimentos contaminados con ZEA y/o sus formas modificadas, estas se absorben rápidamente en el intestino y son transportadas por la sangre para ser metabolizada en el hígado [2], alguna cantidad de micotoxina es secretada por el riñón y otra se acumula en diferentes órganos del cuerpo [3].

ZEA, es una de las micotoxinas, que ejerce diferentes mecanismos de toxicidad en diversos tipos de células, y dosis. ZEA y sus derivados, no sólo pueden estimular la proliferación celular, sino también inhibir la viabilidad e inducen la muerte celular, incluidas la apoptosis y necrosis. Un número creciente de estudios han sugerido que ZEA promueve la proliferación celular atribuyéndose a sus efectos similares al estrógeno. Además, otras investigaciones, han indicado que ZEA causó la muerte celular al afectar la distribución del ciclo celular, estimular el estrés oxidativo e inducir la apoptosis [8].

Por ejemplo, a una dosis baja de ZEA (0.01 μM) puede ejercer efectos similares al estrógeno y propiedades cancerígenas, que pueden estimular la proliferación de células; mientras a una dosis alta de ZEA puede causar la muerte celular al inducir la detención del ciclo celular, estrés oxidativo, daño al ADN, daño mitocondrial y apoptosis. Así es que, varios trabajos han revelado que ZEA puede inhibir la viabilidad celular y causar la apoptosis y la necrosis. Se reporta que, después del tratamiento con ZEA (15-60 μM) durante 24 h, se redujo notablemente la viabilidad de las células de Sertoli, y en las células embrionarias de riñón humano (HEK293) tratadas con ZEA (3-300 μM), podría causar una disminución significativa en la viabilidad celular, con valores de CI_{50} para ZEA de 80 μM ; también se ha evidenciado necrosis en células mononucleares de sangre periférica humana [8].

La línea celular HepG2 se ha empleado como modelo para estudios *in vitro* debido a que tienen muchas de las propiedades de las células hepáticas primarias, incluyendo la activación metabólica [9] y constituyen un sistema de destino para la toxicidad de ZEA, siendo el hígado un sitio prominente para la metabolización y para los procesos oxidativos intensos en el cuerpo [10]. Cuando estas células se expusieron a 100 μM de ZEA a diferentes tiempos de tratamiento (2, 4, 8, 24, 30, 48 y 60 horas), se encontró que se inhibió la viabilidad celular en una forma dependiente del tiempo y ocasionó el 90% de muerte celular después de 60 horas de tratamiento [11].

La apoptosis celular inducida por ZEA se registra a través de vías de señalización del estrés oxidativo del retículo

endoplasmático (RE), y mitocondrial. ZEA y sus metabolitos pueden causar estrés oxidativo y producir especies reactivas de oxígeno (ROS), dañando el ADN [12]. Estudios por microscopia electrónica, indican que, en las células de Sertoli, se examinaron los cambios ultraestructurales después del tratamiento con 5, 10 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de ZEA durante 24 horas, en las cuales observaron vacuolas en el citoplasma, rotura de las mitocondrias y daño en el aparato de Golgi [13].

La apoptosis se caracteriza por la condensación de la cromatina, el encogimiento del citoplasma y la formación de ampollas en la membrana, mientras que la necrosis implica la pérdida de la integridad de la membrana, la subsiguiente inflamación celular y la lisis [1,14].

El objetivo de la presente investigación fue cuantificar la concentración de ZEA en el arroz cultivado en algunos municipios de Norte de Santander; y estimar el efecto citotóxico de esta micotoxina en las células HepG2.

2. Metodología

Áreas de estudio y muestras: dentro de la investigación realizada se tomaron muestras de arroz en cultivos pertenecientes a los municipios de Cúcuta, El Zulia, Puerto Santander y Los Patios del departamento Norte de Santander. Se establecieron 15 muestras de arroz de cultivo las cuales fueron tomadas de los 4 municipios mencionados, y se almacenaron en bolsas de papel Kraft, seguidamente se procesaron y analizaron en el laboratorio de Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN) de la Universidad de Pamplona, atendiendo a la codificación presentada en la tabla 1.

Tabla 1. Procedencia y codificación de las muestras de arroz de cultivo

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

Cuantificación de ZEA por HPLC: se aplicó el método recomendado por la Norma Técnica Colombiana NTC 4881:2000, método de análisis de ZEA de ocurrencia natural,

el cual ha sido estandarizado en el laboratorio de toxicología de la Universidad Nacional de Colombia.

Para lograr la extracción se adicionó 25 g de arroz molido a una mezcla de acetonitrilo: agua (84:16), se filtró y se homogenizó la muestra con ácido acético glacial, seguido a esto, se realizó la purificación en una columna Micotox® 2004. El extracto purificado se diluyó (1:1) con agua para ser inyectado en el HPLC, de este modo, ZEA es separada de las posibles interferencias en una columna de fase reversa (octadecilsilano o RP-18) usando un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (Cromatógrafo: Shimadzu Prominence; Inyector automático: SIL-20AHT; bomba cromatográfica: binaria LC -20AB; horno cromatográfico: CTO-20HT; columna analítica: Merck LiChroCART® 125 – 4 HPLC – Cartridge LiChrospher® 100 RP – 10 (5 µm); detector de fluorescencia de longitudes de onda variables: Fluorescencia (FLD) 20AXL).

La detección se logró a través de un espectrofotómetro de fluorescencia, el cual se acopla a un integrador – graficador para cuantificar la micotoxina utilizando un método de estándar externo [15].

Aislamientos de hongos del género *Fusarium* spp.: se tomaron cuatro granos de arroz de las muestras en las cuales se detectó la presencia de ZEA; y se colocaron en la superficie de placas con medio PDA (Difco Laboratories, Detroit, MI). Seguido a ello, se incubaron a 25°C durante 7 días; se observó el micelio crecido en los granos de arroz, se realizaron repiques hasta obtener un cultivo con apariencia pura, con características pertenecientes al género *Fusarium*, lo que se utilizó para evaluar la pigmentación y morfología de la colonia con base en las descripciones de Crous *et al.*, [16].

A partir de los cultivos aislados, se tomó un disco de 5 mm de diámetro del borde de las colonias y se llevó al centro de cada placa, para determinar la tasa de crecimiento del micelio en tres medios de cultivo PDA (Agar Papa Dextrosa), Avena y Glicerol Dicloran (DG18 %) (Oxoid, Basingstoke, UK). Las placas se incubaron a 25°C y se midió el diámetro de las colonias a los 3 y 7 días [17,18]. Se registró la morfología de las colonias, la pigmentación del micelio aéreo y la morfología de las esporas por microscopía óptica (Microscopio óptico Nikon).

Liofilización de ZEA: este proceso partió de un estándar de la micotoxina ZEA (Micotox® ZEA-HPLC; concentración 10 µg/ml de ZEA en metanol). Consistió en la diálisis en Buffer Tris a 25 mM (24 Horas/ 4°C en agitación), posteriormente se congeló durante 24 horas y finalmente se realizó la liofilización [19].

Cultivo de la línea celular HepG2: el cultivo de las células HepG2 se realizó en RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%, hasta obtener una confluencia del 80%,

seguidamente las células se disociaron con tripsina 0,25% y se sembraron en placas de cultivo de 96 pozos, a una densidad de 20,000 células/100µl, las placas se incubaron durante 24 horas para la adhesión celular y luego se adicionó la micotoxina liofilizada ZEA en DMSO a concentraciones de 1, 2.5, 5, 10, 15 µM durante 48 y 72 horas [19].

Ensayo citotoxicidad: el efecto de ZEA sobre la proliferación celular de HepG2 se determinó usando el ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio). Después de 48 y 72 horas de tratamiento con la micotoxina ZEA, se evaluó la viabilidad celular adicionando 100 µl de MTT (0,5 mg/ml) y se incubó por 4 horas a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad, luego las placas se lavaron con PBS, posteriormente, se adicionó 100 µl de isopropanol ácido para solubilizar los cristales de formazán durante 1 hora en agitación suave. Finalmente, se hizo lectura de la densidad óptica de la solución solubilizada a 492 nm (espectrofotómetro Tecan Spectra classic) [20]. El efecto de ZEA sobre las células HepG2, se calculó con la siguiente fórmula:

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

La concentración inhibitoria (CI₅₀), se evaluó por medio del cálculo de las curvas de inhibición del porcentaje-concentración. Para el ajuste de datos se utilizó el modelo no lineal hiperbólico. El análisis de regresión no lineal, permitió obtener los estimadores del modelo mediante mínimos cuadrados, usando como variable respuesta la dosis inhibitoria y como variable regresora la concentración de la micotoxina ZEA.

Detección de la muerte celular por microscopía electrónica de transmisión (MET): Se sembraron 3x10⁶ células HepG2 en placas de cultivo durante 24 horas para permitir la adhesión celular, seguidamente las células HepG2 fueron expuestas a una concentración de ZEA de 10 µM durante 48 horas. Al finalizar el tiempo del tratamiento, la monocapa celular, se disoció con tripsina al 0,25%, se lavó con PBS y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.

El pellet celular se fijó por un período de 1 a 2 horas en una mezcla 3:3 (glutaraldehídoformaldehído al 3 % en tampón cacodilato 0,1 M, pH 6,3). La suspensión celular se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, el pellet se lavó con tampón cacodilato y se postfijó por 3 a 12 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% preparado en el mismo tampón cacodilato. Concluido este tiempo, el pellet se lavó con solución tampón y se deshidrató en concentraciones ascendentes de alcohol etílico seguido de óxido de propileno, y, por último, se infiltró el pellet celular con resina epoxídica a concentraciones ascendentes y se incluyó en resina epoxídica. Del pellet de células incluidas de 90 nanómetros de espesor, se contrastaron con citrato de plomo y acetato de uranilo para el análisis ultraestructural. Los cambios

morfológicos propios de la apoptosis en las células HepG2, se analizaron por microscopía electrónica de transmisión (H-7000, Hitachi) [19].

3. Resultados y Discusión

Cuantificación de ZEA: Las concentraciones de ZEA obtenidas para las 15 muestras de arroz en cultivo, se encuentran registrados en la tabla 2.

Tabla 2. Cuantificación de ZEA en las muestras de arroz en cultivo

CÓDIGO	ZEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
M001	N.D*
M002	N.D*
M003	N.D*
M004	N.D*
M005	N.D*
M006	N.D*
M007	N.D*
M008	N.D*
M009	98
M010	167
M011	490
M012	N.D*
M013	N.D*
M014	N.D*
M015	N.D*

(*) No Detectable

La presencia de ZEA se detectó en el 20 % de las muestras analizadas procedentes de los municipios de El Zulia y Puerto Santander; en concentraciones que variaron entre 98 y 490 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Municipios que, por su ubicación geográfica presentan condiciones ambientales propicias para el desarrollo de *Fusarium* spp., así como para la producción de ZEA que, depende en gran parte de factores como temperatura, humedad relativa y actividad de agua. Investigaciones han demostrado que los altos niveles de ZEA en granos, frecuentemente se encuentran en entornos cálidos y húmedos [15, 21] y se sintetiza a temperaturas de 25°C con un Aw de 0.96 [7].

La cuantificación de ZEA en este estudio, coincide con reportes realizados en arroz en diferentes países, en España, Ibáñez-vea *et al.* [22] reportaron que el 50% de las muestras de arroz analizadas por Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC), presentaban una contaminación con un nivel promedio de 5.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ZEA. Valores más altos de ZEA se detectaron por Cromatografía en Capa Fina (CCF) en muestras de arroz parbolizado en Brasil, con concentraciones entre 317- 396 $\mu\text{g}/\text{kg}$, en el 19% de las muestras analizadas [23].

En India, Rai *et al.* [24] detectaron ZEA en el 80% de las muestras de arroz analizadas con un promedio de 94.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, utilizando HPLC. En consecuencia, la contaminación por micotoxinas está influenciada por deficiencias en el manejo y almacenamiento del grano, daños causados por insectos o plagas, así como también, por distintos factores como

condiciones climáticas que desencadenan la proliferación de hongos filamentosos [25].

Es de gran importancia conocer la incidencia de hongos productores de micotoxinas en cereales como el arroz; ya que la continua exposición, puede ocasionar graves riesgos para la salud humana y animal [26]; además, el crecimiento de hongos es una de las principales causas del deterioro de los cereales [27].

Aislamiento de *Fusarium* spp.: Se corroboró morfológicamente la presencia de *Fusarium* spp. en las muestras donde se cuantificó ZEA. Como se evidencia en la Figura 1.

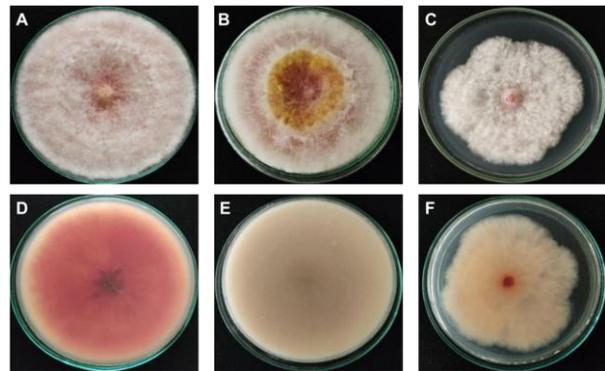


Figura 1. Características macroscópicas de *Fusarium* spp. (A-C) Anverso de la colonia de *Fusarium* spp. (D-F) Reverso de la colonia de *Fusarium* spp. en medio PDA, Avena, y DG18, respectivamente.

Se pudieron evidenciar las características morfológicas macroscópicas, como el color y la textura de las colonias. En medio PDA, se produjo gran cantidad de micelio aéreo algodonoso de color blanco, con tonalidades rosadas, mientras que en el reverso del agar se observaron pigmentos color rosa-púrpura. Del mismo modo, en el medio Avena, se presentó abundante micelio algodonoso con dos coloraciones diferentes, blanco y amarillo, tornándose rosado a medida que maduraba el cultivo, no presentó pigmentos al reverso del agar.

En el medio DG18, se obtuvo un micelio aéreo algodonoso blanco con centro rosado de crecimiento irregular, es decir, al medir el diámetro desde el centro a cualquier borde, la medida no era la misma. En el reverso se observó una pigmentación de color rosado en el centro y blanco en el resto del cultivo. Mediante el uso de estos medios de cultivo, se pudo conseguir una variación en la fuente de carbono aportada, siendo uno de los factores principales que influyen en el crecimiento fúngico, sin embargo, el color del micelio y pigmentos que desarrollan depende de la especie, y son muy variables, siendo blanco, crema, anaranjado, rosa, rojizo o púrpura. Lo anterior permite inferir que las características morfológicas de una especie que son comunes en un medio

de cultivo, pueden perderse o alterarse cuando se realiza el aislamiento en un medio diferente [18].

En la tabla 3 se muestra el crecimiento de *Fusarium* spp. en los tres medios de cultivo, a partir del cultivo puro aislado, determinando que en PDA y Avena hubo mayor desarrollo, alcanzando en el séptimo día un diámetro de 90 mm, mientras que en el medio DG18, presentó un diámetro de 77 mm.

Tabla 3. Comparación del crecimiento micelial de *Fusarium* spp.

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

Con respecto a la morfología microscópica, se evidenció la presencia de macroconidias, las cuales presentaron forma de medialuna, hialinas y multiseptadas (entre 4 y 5), y células apicales alargadas, curvadas y basales con forma de pie, como se evidencia en la Figura 2.

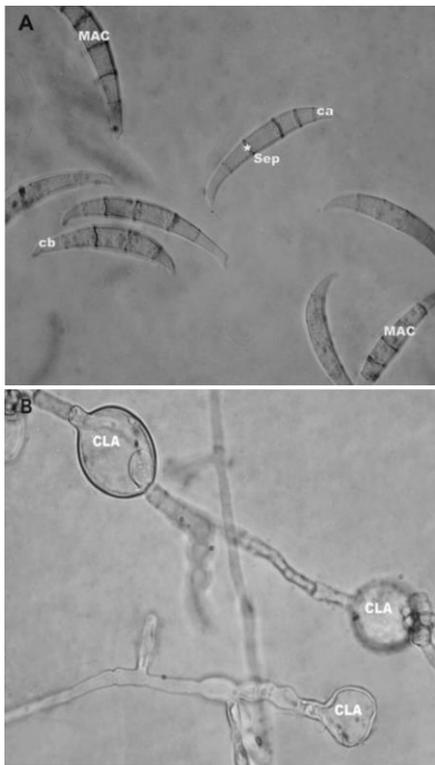


Figura 2. Características microscópicas de *Fusarium* spp. A)

Macroconidias; B) Clamidosporas. MAC: Macroconidias, Sep:septos, cb: célula basal, ca: célula apical, CLA: Clamidosporas.

Se observaron estructuras de resistencia como las clamidosporas, globosas, lisas de doble pared, simples, tanto en orientaciones terminal e intercalar, las cuales permitieron la identificación presuntiva a nivel de género que generalmente se realiza a partir de la apariencia de la colonia, seguido de la confirmación microscópica [28]. Sin embargo,

el conocimiento taxonómico de *Fusarium* spp. es limitado debido a la similitud de las especies y la insuficiencia de caracteres morfológicos distintivos, con identificación basada en macro y microconidios en varias especies, identificación basada en macro y microconidios en varias especies [18].

Los resultados obtenidos son semejantes a los reportados por Husna *et al.* [29], quienes aislaron a *Fusarium* spp., de la raíz, tallo, hojas y semillas de plantas de arroz. En medio PDA, reportaron el diámetro de las colonias después de 3 días de incubación el cual fue en promedio de 54.5 mm. Además, los macroconidios nacidos en los esporodocios estaban constituidos por tres septos, fusiformes o en media luna, con células apicales ligeramente curvada y células basales en forma de pie. Las clamidosporas se produjeron abundantemente, en orientación intercalar, terminal, solos o en pares.

En consecuencia, no sólo se detectaron niveles considerables de ZEA en el arroz de cultivo, sino que, además, se estableció la presencia de *Fusarium* spp., reconociendo que este es uno de los principales hongos toxigénicos.

Efecto citotóxico de ZEA sobre células HepG2

La viabilidad se determinó por la capacidad de formación de los cristales de formazán por las células HepG2 metabólicamente activas. Las células que no fueron expuestas a ZEA, presentaron una actividad metabólica, debido a la reducción del MTT en cristales de formazán (Figura 3A), en comparación con las células tratadas por 72 horas con una concentración de 15 μ M, en las cuales la formación de cristales de formazán por la actividad metabólica no se observó, por lo tanto, se evidencia el efecto antiproliferativo que causa ZEA en las células HepG2 como se muestra en la Figura 3B.

Con el tratamiento a diferentes concentraciones de ZEA (1, 2.5, 5, 10 y 15 μ M), mostró que causó efectos citotóxicos sobre la proliferación de las células HepG2. En las Figuras 4A y 4B, se evidenció que ZEA promueve la inhibición de la proliferación celular, de manera dependiente de la concentración a las 48 y 72 horas de exposición, por lo tanto, se observó un efecto significativo a partir de 5 μ M (60,88% DE \pm 3,89 y 66,02% DE \pm 4,13) en comparación con el control (97,78% DE \pm 0,27 y 98,57% DE \pm 0,57), respectivamente (p<0,0001).

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

Estudios citotóxicos de ZEA a concentraciones entre 20 y 220 μM durante una exposición de 24 horas en células HepG2 indican reducción de la proliferación celular hasta un 55% de manera dependiente de la dosis [30]. Otros estudios indican que esta micotoxina provoca una marcada disminución de la viabilidad celular en función de la dosis (100 μM) y el tiempo (hasta 60 horas) en células HepG2 [31]. También se reporta que ZEA y sus metabolitos inhibieron el crecimiento celular de células HepG2 de manera dependiente de la dosis y el tiempo [32], así como en las líneas celulares de intestino humano HCT116 y riñón HEK293 indujo una marcada disminución de la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis (25 a 200 μM) [33]. Además, la viabilidad de las células TM4 disminuyó de manera dependiente de la dosis después del tratamiento con 1 hasta 100 μM ZEA durante 24 h en comparación con el grupo control. Estos datos revelaron que ZEA podría inhibir el crecimiento de las células TM4 [12].

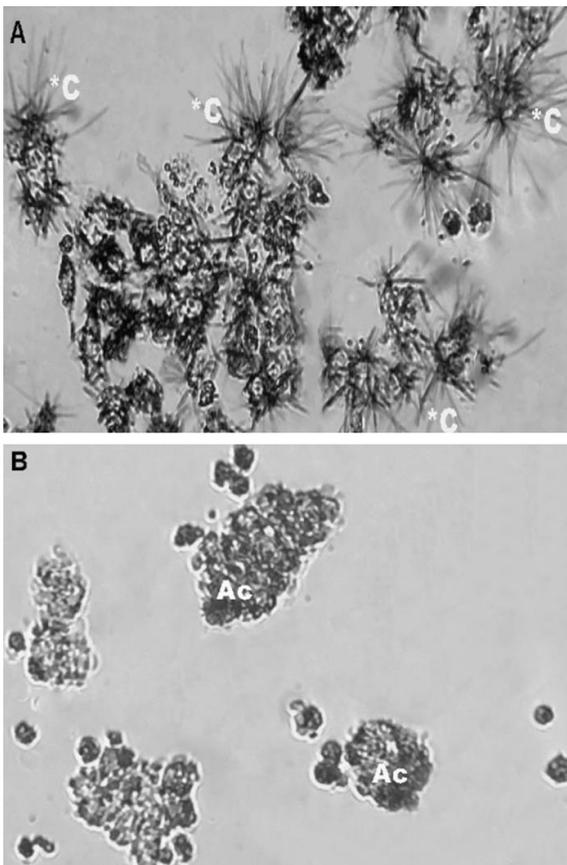


Figura 3. Evaluación de la actividad metabólica en las células HepG2 por reducción de MTT. A) Células HepG2 sin tratar. B) Células HepG2 expuestas a 15 μM de ZEA durante 48 horas. Aumento:400. C= Cristales de Formazán, Ac= Agrupación celular.

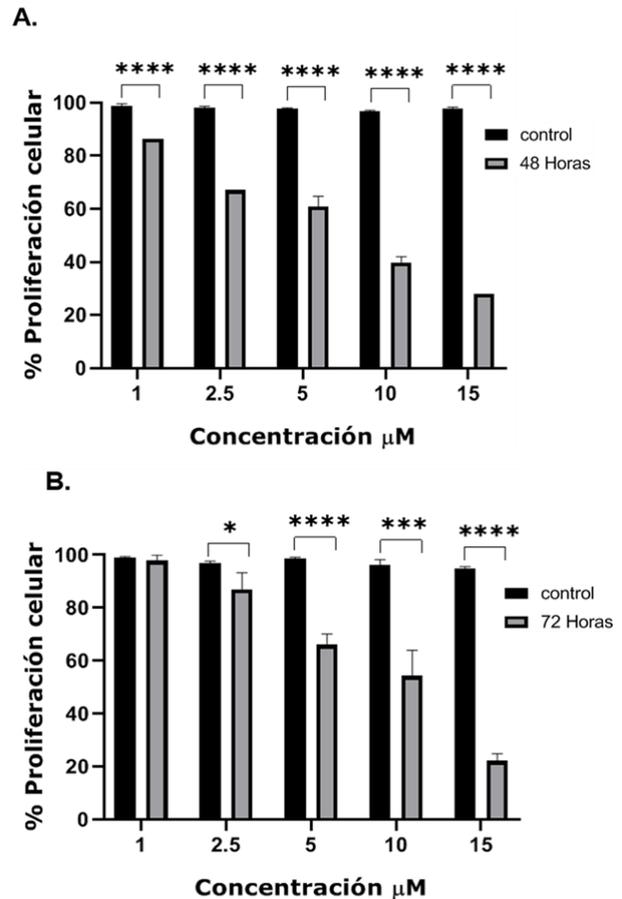


Figura 4. Proliferación de las células HepG2 tratadas con diferentes concentraciones de ZEA (1, 2.5, 5, 10 y 15 μM).

Del mismo modo, induce citotoxicidad en células hepáticas humanas CCL13 al inhibir la proliferación celular (> 50%) de manera dependiente de la dosis (10 a 150 μM) y tiempo de 12 y 24 horas de exposición a concentraciones de ZEA de hasta 200 μM [34]. Así mismo, ZEA disminuyó la viabilidad celular (36%) en leucocitos humanos con un efecto citotóxico dependiente de la concentración a un tiempo de exposición corto (1 hora) [35]. También, ZEA posee una acción inhibidora en la proliferación de células MTEC1 (línea celular epitelial tímica 1). Igualmente, en linfocitos T activados, con tratamiento por 24 horas de ZEA a concentraciones entre 10 a 40 μM , se observó que, disminuyó la viabilidad celular [36] y a 40 μM inhibió significativamente la proliferación de IPEC-J2 (línea celular epitelial intestinal de cerdo) [37]. De esta manera, células de la granulosa porcina se expusieron a concentraciones entre 10 y 30 μM de ZEA durante 24 horas, evidenciándose una reducción en la proliferación de manera dependiente de la dosis [38]. Finalmente, ZEA a concentraciones hasta 200 μM y a 36 horas exposición, redujo la proliferación de células de Sertoli de rata de manera dependiente de la dosis [39].

Además, los resultados revelaron que la concentración inhibitoria (CI_{50}) obtenida después de las 48 y 72 horas del tratamiento celular con ZEA, indujo una reducción en la proliferación celular en función de la dosis y el tiempo de exposición puesto que, a las 48 horas, el valor de CI_{50} fue de $6,40 \mu\text{M DE}\pm 0,33$ y a las 72 horas la CI_{50} fue mayor con un valor de $9,41 \mu\text{M DE}\pm 0,64$. De modo que, a mayor tiempo, mayor es la CI_{50} necesaria para inhibir el 50% de la población celular de HepG2. Teniendo en cuenta estos resultados, se observó que, el efecto citotóxico sobre las células HepG2 es mayor a medida que aumenta la concentración de ZEA, indicando que la exposición a esta micotoxina afecta la viabilidad celular y por ende genera pérdida de la actividad metabólica evidenciándose efecto antiproliferativo de esta micotoxina sobre las células HepG2.

Se reporta una CI_{50} desde $100 \mu\text{M}$ hasta $268 \mu\text{M}$ de ZEA para diferentes células, por ejemplo, para HepG2 [11, 10, 40] y CCL13 después del tratamiento por 24 horas [34]. Estos resultados muestran que ZEA es citotóxica, además, en células como los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), también tienen efecto citotóxico y en células HepG2 y CHO-K1 causa estrés oxidativo [32, 40]. Por otro lado, para las células HCT116 y HEK293 después del tratamiento con ZEA por 24 horas los valores de la CI_{50} fueron de 100 y $75 \mu\text{M}$, respectivamente [33]. La citotoxicidad que causa ZEA en las células HepG2 se relaciona con el estrés oxidativo y daño en el ADN [12]. En células de Sertoli de rata la CI_{50} fue de $150 \mu\text{M}$ después 24 horas de tratamiento con ZEA [39].

No obstante, los resultados obtenidos variaron, debido a las condiciones evaluadas en este estudio, tales como la liofilización de la micotoxina, el tipo de línea celular, concentraciones, tiempo de exposición y las características del patrón utilizado, lo que permitió evidenciar que el efecto citotóxico de ZEA sobre las células HepG2, es mayor a medida que aumenta la concentración y el tiempo. De tal modo, se puede inferir que la exposición a ZEA genera disminución en la proliferación celular, pérdida de la actividad metabólica y causa la muerte en diferentes tipos de células [8].

Cambios morfológicos en células HepG2 causados por ZEA

Mediante microscopía electrónica de transmisión se observaron los cambios morfológicos de HepG2 después del tratamiento con $10 \mu\text{M}$ de ZEA durante 48 horas. En la figura 5A las células HepG2 del grupo control, se observó células con el núcleo de forma redondeada con zonas electrodensas donde se ubica la cromatina y uno o varios nucléolos en comparación con las zonas electrodensas que representan el nucleoplasma y el citoplasma, además, la membrana plasmática y nuclear se mantienen intacta con uniones célula a célula en la monocapa, conservando la morfología epitelial (Figura 5).

En las células HepG2 tratadas con $10 \mu\text{M}$ de ZEA se evidenciaron los siguientes cambios morfológicos como son contracción celular, reducción del volumen celular (picnosis) pérdida del contacto célula a célula, cromatina dispersa y condensada, fragmentación nuclear (cariorexis), formación de vesículas en la membrana plasmática, pero manteniendo intacta la membrana plasmática, y finalmente la fragmentación celular y formación de los cuerpos apoptóticos (Figura 5B). Estos cambios morfológicos pueden estar relacionados con un proceso apoptótico en la célula HepG2 inducido por la micotoxina ZEA.

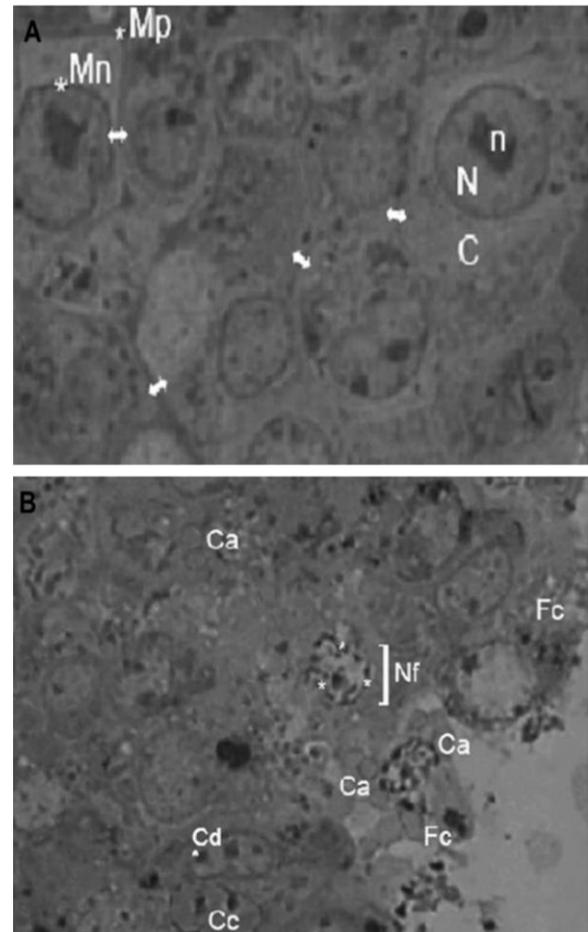


Figura 5. Microscopía electrónica de transmisión de las células HepG2 expuestas a $10 \mu\text{M}$ de ZEA durante 48 horas. A) Control negativo. B) Células tratadas con $10 \mu\text{M}$ de ZEA. Aumento: 4.000X. Mp= Membrana Plasmática, C= Citoplasma, N= Núcleo, n= nucléolo, Mn= Membrana nuclear, Cm= Cromatina, Flecha con doble punta= Contacto célula a célula, Nf= Núcleo fragmentado, Cd= Cromatina dispersa, Ca= Cuerpos apoptóticos, Fc= Fragmentación celular, Cc= Célula contraída.

En estudios por microscopía electrónica indican que las células TM4 mostraron cambios morfológicos, incluidos la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y la distribución desigual de la cromatina nuclear. Las alteraciones significativas de las mitocondrias fueron en las crestas mitocondriales y la matriz. Las membranas de las crestas mitocondriales se rompieron y deformaron y se

volvieron borrosas e incluso desaparecieron. La matriz mitocondrial también se volvió invisible. Estos datos sugirieron que ZEA puede inducir la muerte celular y la apoptosis [41].

También se reporta cambios en el núcleo inducidos por ZEA en células MTEC1, donde se encontró condensación de la cromatina y núcleos más grande [42], así como en linfocitos T activados, ZEA a concentración de 20 μ M durante 48 horas de tratamiento provocó daños en la ultraestructura intracelular en las que se detectaron: perforación de la membrana celular, aumento de la heterocromatina nuclear, vascularización de las mitocondrias y citoplasma [36]. Igualmente, al tratar con ZEA las células de Leydig de los testículos de rata por 12 horas, estas mostraron cambios morfológicos de la apoptosis como son condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos [43].

4. Conclusiones

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

A partir de las muestras que se detectó y cuantificó ZEA, se aisló e identificó morfológicamente el hongo toxigénico *Fusarium* spp., a partir de la descripción macroscópica y microscópica., por lo anterior, es de gran importancia realizar detecciones consecutivas, tanto de las micotoxinas como del hongo, en atención a los efectos adversos para la salud.

Las características observadas con el ensayo MTT y por microscopía electrónica de transmisión permitieron evidenciar que ZEA ejerció un efecto citotóxico sobre las células HepG2, disminuyendo la actividad metabólica, y, como consecuencia de ello, causando un efecto antiproliferativo de manera dependiente a la concentración y al tiempo de exposición; induciendo cambios morfológicos relacionados con la muerte celular por apoptosis, como la reducción del volumen celular, pérdida del contacto célula-célula, condensación y dispersión de la cromatina, formación de vesículas, fragmentación nuclear y celular, y formación de cuerpos apoptóticos.

Agradecimientos

A la Universidad de Pamplona por la financiación de esta investigación. Al semillero de investigación en Biología Molecular y Genética (BIOMOGEN). Al Centro de Microscopía Electrónica “Dr. Ernesto Palacios Prú”; Al Instituto de Inmunología Clínica (Mérida, Venezuela). Al Grupo de Investigación en Microbiología y Biotecnología (GIMBIO). Al laboratorio de Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia.

Referencias

- [1] Zhang, X. Chen, C. Gueydan, y J. Han, «Plasma membrane changes during programmed cell deaths», *Cell Res.*, vol. 28, n.º 1, pp. 9-21, ene. 2018, doi: 10.1038/cr.2017.133.
- [2] Liu y T. Applegate, «Zearalenone (ZEN) in Livestock and Poultry: Dose, Toxicokinetics, Toxicity and Estrogenicity», *Toxins*, vol. 12, n.º 6, p. 377, jun. 2020, doi: 10.3390/toxins12060377.
- [3] Ben Salah-Abbès, H. Belgacem, K. Ezzdini, M. A. Abdel-Wahhab, y S. Abbès, «Zearalenone nephrotoxicity: DNA fragmentation, apoptotic gene expression and oxidative stress protected by *Lactobacillus plantarum* MON03», *Toxicon*, vol. 175, pp. 28-35, feb. 2020, doi: 10.1016/j.toxicon.2019.12.004.
- [4] Chandravarman, D. Agyei, y A. Ali, «Green and sustainable technologies for the decontamination of fungi and mycotoxins in rice: A review», *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 124, pp. 278-295, jun. 2022, doi: 10.1016/j.tifs.2022.04.020.
- [5] Golge y B. Kabak, «Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in cereals and cereal products from Turkey», *Food Control*, vol. 110, p. 106982, abr. 2020, doi: 10.1016/j.foodcont.2019.106982.
- [6] Kowalska, D. E. Habrowska-Górczyńska, K. A. Urbanek, K. Domińska, A. Sakowicz, y A. W. Piastowska-Ciesielska, «Estrogen receptor β plays a protective role in zearalenone-induced oxidative stress in normal prostate epithelial cells», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 172, pp. 504-513, may 2019, doi: 10.1016/j.ecoenv.2019.01.115.
- [7] Han *et al.*, «Research Progress of Safety of Zearalenone: A Review», *Toxins*, vol. 14, n.º 6, Art. n.º 6, jun. 2022, doi: 10.3390/toxins14060386.
- [8] Zheng *et al.*, «Zearalenone Promotes Cell Proliferation or Causes Cell Death?», *Toxins*, vol. 10, n.º 5, p. 184, may 2018, doi: 10.3390/toxins10050184.
- [9] Polidoro, E. Ferrari, S. Marzorati, A. Leo, y M. Rasponi, «Experimental liver models: From cell culture techniques to microfluidic organs-on-chip», *Liver Int.*, vol. 41, n.º 8, pp. 1744-1761, 2021, doi: 10.1111/liv.14942.
- [10] Karaman, M. Zeybel, y S. Ozden, «Evaluation of the epigenetic alterations and gene expression levels of HepG2 cells exposed to zearalenone and α -zearalenol», *Toxicol. Lett.*, vol. 326, pp. 52-60, jun. 2020, doi: 10.1016/j.toxlet.2020.02.015.
- [11] Gazzah, E. El Golli Bennour, C. Bouaziz, S. Abid, M. Ladjimi, y H. Bacha, «Sequential events of apoptosis induced by zearalenone in cultured hepatocarcinoma cells», *Mycotoxin Res.*, vol. 26, n.º 3, pp. 187-197, ago. 2010, doi: 10.1007/s12550-010-0053-8.
- [12] Zheng *et al.*, «ROS-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Zearalenone in Mouse Sertoli Cells via ER Stress and the ATP/AMPK Pathway», *Toxins*, vol. 10, n.º 1, p. 24, ene. 2018, doi: 10.3390/toxins10010024.
- [13] Zheng *et al.*, «Zearalenone impairs the male reproductive system functions via inducing structural and functional alterations of sertoli cells», *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 42, pp. 146-155, mar. 2016, doi: 10.1016/j.etap.2016.01.013.
- [14] Aizawa, G. Brar, y H. Tsukamoto, «Cell Death and Liver Disease», *Gut Liver*, vol. 14, n.º 1, pp. 20-29, ene. 2020, doi: 10.5009/gnl18486.
- [15] Rojas Contreras y A. X. Roig Sagués, Estudio de la incidencia de aflatoxinas, zearalenona y desoxinivalenol en el arroz producido en las principales zonas arroceras de Colombia. 2021.

- [16] W. Crous *et al.*, «Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell», *Stud. Mycol.*, vol. 98, p. 100116, mar. 2021, doi: 10.1016/j.simyco.2021.100116.
- [17] Gupta, A. Misra, y R. Gaur, «Growth Characteristics of Fusarium Spp. Causing Wilt Disease in Psidium Guajava L. in India», *J. Plant Prot. Res.*, 2010, doi: 10.2478/v10045-010-0076-3.
- [18] Moura, L. A. M. de Castro, M. P. Culik, A. A. R. Fernandes, P. M. B. Fernandes, y J. A. Ventura, «Culture medium for improved production of conidia for identification and systematic studies of Fusarium pathogens», *J. Microbiol. Methods*, vol. 173, p. 105915, jun. 2020, doi: 10.1016/j.mimet.2020.105915.
- [19] Garzón-González, N. Jaimes-Mendez, L. Rojas-Contreras, S. Salmen-Halabi, y M. A. Gil-Durán, «Efecto citotóxico de Deoxinivalenol sobre la proliferación de la línea celular HepG2», *Rev. MVZ Córdoba*, vol. 26, n.º 3, Art. n.º 3, ago. 2021, doi: 10.21897/rmvz.2080.
- [20] Oh y J. Hong, «Application of the MTT-based colorimetric method for evaluating bacterial growth using different solvent systems», *LWT*, vol. 153, p. 112565, ene. 2022, doi: 10.1016/j.lwt.2021.112565.
- [21] Ropejko y M. Twarużek, «Zearalenone and Its Metabolites—General Overview, Occurrence, and Toxicity», *Toxins*, vol. 13, n.º 1, Art. n.º 1, ene. 2021, doi: 10.3390/toxins13010035.
- [22] Ibáñez-Vea, R. Martínez, E. González-Peñas, E. Lizarraga, y A. López de Cerain, «Co-occurrence of aflatoxins, ochratoxin A and zearalenone in breakfast cereals from spanish market», *Food Control*, vol. 22, n.º 12, pp. 1949-1955, dic. 2011, doi: 10.1016/j.foodcont.2011.05.008.
- [23] Dors, V. da S. Bierhals, y E. Badiale-Furlong, «Parboiled rice: chemical composition and the occurrence of mycotoxins», *Food Sci. Technol.*, vol. 31, pp. 172-177, mar. 2011, doi: 10.1590/S0101-20612011000100025.
- [24] Rai, S. Dixit, S. P. Singh, N. K. Gautam, M. Das, y A. Tripathi, «Presence of Zearalenone in Cereal Grains and Its Exposure Risk Assessment in Indian Population», *J. Food Sci.*, vol. 83, n.º 12, pp. 3126-3133, 2018, doi: 10.1111/1750-3841.14404.
- [25] Gruber-Dorninger, T. Jenkins, y G. Schatzmayr, «Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey», *Toxins*, vol. 11, n.º 7, Art. n.º 7, jul. 2019, doi: 10.3390/toxins11070375.
- [26] Amirahmadi, S. Shoeibi, H. Rastegar, M. Elmi, y A. Mousavi Khaneghah, «Simultaneous analysis of mycotoxins in corn flour using LC/MS-MS combined with a modified QuEChERS procedure», *Toxin Rev.*, vol. 37, n.º 3, pp. 187-195, jul. 2018, doi: 10.1080/15569543.2017.1354306.
- [27] Kadakal y T. K. Tepe, «Is ergosterol a new microbiological quality parameter in foods or not?», *Food Rev. Int.*, vol. 35, n.º 2, pp. 155-165, feb. 2019, doi: 10.1080/87559129.2018.1482495.
- [28] «Fungi producing significant mycotoxins», *IARC Sci. Publ.*, n.º 158, pp. 1-30, 2012.
- [29] Husna, L. Zakaria, y N. M. I. Mohamed Nor, «Fusarium commune associated with wilt and root rot disease in rice», *Plant Pathol.*, vol. 70, n.º 1, pp. 123-132, 2021, doi: 10.1111/ppa.13270.
- [30] Ayed-Boussema *et al.*, «The mycotoxin Zearalenone induces apoptosis in human hepatocytes (HepG2) via p53-dependent mitochondrial signaling pathway», *Toxicol. In Vitro*, vol. 22, n.º 7, pp. 1671-1680, oct. 2008, doi: 10.1016/j.tiv.2008.06.016.
- [31] Gazzah, L. Camoin, S. Abid, C. Bouaziz, M. Ladjimi, y H. Bacha, «Identification of proteins related to early changes observed in Human hepatocellular carcinoma cells after treatment with the mycotoxin Zearalenone», *Exp. Toxicol. Pathol.*, vol. 65, n.º 6, pp. 809-816, sep. 2013, doi: 10.1016/j.etp.2012.11.007.
- [32] Tatay, G. Meca, G. Font, y M. J. Ruiz, «Cytotoxic and interactive effects of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol and formation of metabolites in HepG2 cells», *Rev Toxicol*, pp. 187-195, 2014.
- [33] Ben Salem *et al.*, «Crocic acid and Quercetin protect HCT116 and HEK293 cells from Zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress», *Cell Stress Chaperones*, vol. 20, n.º 6, pp. 927-938, nov. 2015, doi: 10.1007/s12192-015-0613-0.
- [34] Lee *et al.*, «Cytotoxicity and the induction of the stress protein Hsp 70 in Chang liver cells in response to zearalenone-induced oxidative stress», *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 36, n.º 2, pp. 732-740, sep. 2013, doi: 10.1016/j.etap.2013.06.005.
- [35] Morlett, M. Viera-Limón, C. Sierra-Rivera, D. Luque Contreras, y A. Zugasti-Cruz, «Zearalenone Induced Cytotoxicity and Oxidative Stress in Human Peripheral Blood Leukocytes», *Toxicol Open Access*, vol. 1, p. 102, oct. 2015, doi: 10.4172/2476-2067.1000102.
- [36] Cai *et al.*, «Decrease in immune function and the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) overactivation in apoptosis during T lymphocytes activation induced by zearalenone, deoxynivalenol, and their combinations», *Chemosphere*, vol. 255, p. 126999, sep. 2020, doi: 10.1016/j.chemosphere.2020.126999.
- [37] Wang *et al.*, «Transcriptional profiling of zearalenone-induced inhibition of IPEC-J2 cell proliferation», *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology*, vol. 172, pp. 8-14, oct. 2019, doi: 10.1016/j.toxicol.2019.10.004.
- [38] Liu *et al.*, «Mycotoxin zearalenone exposure impairs genomic stability of swine follicular granulosa cells in vitro», *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 14, n.º 3, pp. 294-305, feb. 2018, doi: 10.7150/ijbs.23898.
- [39] Xu, J. Hu, B.-P. Guo, Y.-R. Niu, C. Xiao, y Y.-X. Xu, «Exploration of intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in zearalenone-treated rat sertoli cells», *Environ. Toxicol.*, vol. 31, n.º 12, pp. 1731-1739, 2016, doi: 10.1002/tox.22175.
- [40] Tatay, S. Espín, A.-J. García-Fernández, y M.-J. Ruiz, «Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells», *Toxicol. In Vitro*, vol. 45, pp. 334-339, dic. 2017, doi: 10.1016/j.tiv.2017.04.026.
- [41] Zheng *et al.*, «Zearalenone altered the cytoskeletal structure via ER stress- autophagy- oxidative stress pathway in mouse TM4 Sertoli cells», *Sci. Rep.*, vol. 8, n.º 1, Art. n.º 1, feb. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21567-8.
- [42] Zhang *et al.*, «Transcriptional profiling analysis of Zearalenone-induced inhibition proliferation on mouse thymic epithelial cell line 1», *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 153, pp. 135-141, may 2018, doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.005.
- [43] Wang *et al.*, «Zearalenone induces apoptosis and cytoprotective autophagy in primary Leydig cells», *Toxicol. Lett.*, vol. 226, n.º 2, pp. 182-191, abr. 2014, doi: 10.1016/j.toxlet.2014.02.003.