



Citotoxicidad de la ocratoxina A sobre la propagación celular de HepG2

Ochratoxin A cytotoxicity on HepG2 cell propagation

Francisco J Contreras-Altahona¹; Nancy Jaimes-Méndez^{2*}; Manuel A Gil-Durán³; Olga L Rojas-Contreras⁴

¹Est. de Biol, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia. e-mail: francisco.contreras@unipamplona.edu.co; <https://orcid.org/0000-0001-9882-5673>

²Lic, M.Sc, Ph.D, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colombia. e-mail: njaimes@unipamplona.edu.co; <https://orcid.org/0000-0001-8089-5358>

³Ing. Sist, Universidad de Pamplona, Pamplona Colombia. e-mail: manuel.gil@unipamplona.edu.co; <https://orcid.org/0000-0002-7791-8923>

⁴Microb, M.Sc, Ph.D, Universidad de Pamplona, Pamplona Colombia. e-mail: olrojas@unipamplona.edu.co; <https://orcid.org/0000-0001-9184-9031>

Correspondencia: njaimes@unipamplona.edu.co

Recibido: Septiembre 22, 2023. Aceptado: Noviembre 08, 2023. Publicado: Noviembre 20, 2023

Resumen

La ocratoxina A (OTA) es un metabolito secundario producido por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, con efecto tóxico para diversos seres vivos. OTA se encuentra en una gran diversidad de alimentos y piensos para animales, por esta razón radica la importancia de estimar los efectos tóxicos de la OTA en la línea celular HepG2 mediante la inhibición de la proliferación celular, además, determinar los cambios morfológicos en las células y su correlación con la apoptosis. La línea celular HepG2 se expuso durante 48 y 72 horas a concentraciones de 1,0; 2,5; 10 y 15 μM de OTA liofilizada; a continuación, la actividad antiproliferativa de la micotoxina se calculó aplicando el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio). Posteriormente, en células HepG2 tratadas con 10 μM de OTA por 48 horas se analizaron los cambios morfológicos relacionados con la muerte celular apoptótica por microscopía electrónica de transmisión. La propagación de las células HepG2 se afecta desde la concentración de 2,5 μM de OTA, en contraste con el control. Después, se realizó la medición de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) de OTA sobre las células HepG2, esta fue de 9,19 μM DE \pm 0,68 y de 9,98 μM DE \pm 0,4, a las 48 y 72 horas, respectivamente. Se evidenciaron alteraciones morfológicas relacionadas con la muerte celular por apoptosis en las células HepG2, como la fragmentación del núcleo (cariorrhexis), fragmentación celular y formación de los cuerpos apoptóticos.

Palabras clave: Ocratoxina A, proliferación, citotoxicidad.

Abstract

Ochratoxin A (OTA) is a secondary metabolite produced by fungi of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera, with a toxic effect on various living beings. OTA is found in a wide variety of foods and animal feed, for this reason lies the importance of estimating the toxic effects of OTA on the HepG2 cell line by inhibiting cell proliferation, in addition, determining the morphological changes in the cells, and its correlation with apoptosis. The HepG2 cell line was exposed for 48 and 72 hours at concentrations of 1.0; 2.5; 10 and 15 μM lyophilized OTA; Next, the antiproliferative activity of the mycotoxin was calculated using the MTT colorimetric method (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Subsequently, in HepG2 cells treated with 10 μM OTA for 48 hours, the morphological changes related to apoptotic cell death were analyzed by transmission electron microscopy. The propagation of HepG2 cells is affected from the concentration of 2.5 μM of OTA, in contrast to the control. Then, the measurement of the mean inhibitory concentration (IC₅₀) of OTA on HepG2 cells was carried out, this was 9.19 μM SD \pm 0.68 and 9.98 μM SD \pm 0.4, at 48 and 72 hours, respectively. Morphological alterations related to cell death by apoptosis in HepG2 cells were evidenced, such as fragmentation of the nucleus (karyorrhexis), cell fragmentation and formation of apoptotic bodies.

Keywords: Ochratoxin A, proliferation, cytotoxicity.

1. Introducción

La ocratoxina A (OTA), es una toxina sintetizada por diversos hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, es nociva y está extendida en la naturaleza, con efecto tóxico para los seres vivos, y está distribuida desde alimentos cultivados y procesados hasta en organismos que los consumen. La OTA es un metabolito secundario, formada por

una molécula que posee un anillo de 3,4-dehidro-metil-isocumarina unido por medio del grupo carboxilo y un enlace tipo amida a una molécula de fenilalanina, con fórmula molecular C₂₀H₁₈ClNO₆ y peso molecular de 403,813g/mol, también, es un sólido cristalino blanco, inodoro, termoestable, con escasa solubilidad en agua (Figura 1) [1, 2, 3]. Se describen cinco tipos de ocratoxinas: A, B, C, α , β , siendo la más tóxica la ocratoxina A [4].

Debido a la ubicuidad de los hongos ocratoxigénicos, se informa que la OTA es uno de los contaminantes más comunes de los alimentos, como cereales, granos, frutas, verduras, huevos, vino, cerveza, así como productos derivados de la carne, lácteos y cereales; igualmente se encuentra en piensos, entre otros. La distribución generalizada en la cadena alimenticia de OTA favorece la exposición significativa para los seres humanos y animales. Además, existen prácticas agrícolas y condiciones medioambientales (humedad y temperatura) que durante el almacenamiento y el transporte contribuyen a la presencia de esta micotoxina en los alimentos [1, 2, 3, 5, 6, 7].

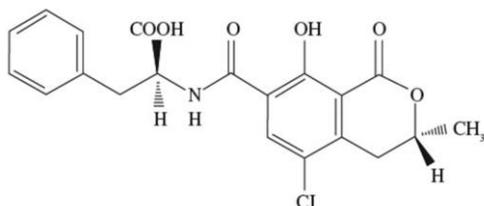


Figura 1. Estructura química de OTA. (Tao, et al. 2018)

La presencia de micotoxinas como la OTA en los alimentos y piensos tiene efectos adversos tanto en la salud humana como animal, ya que pueden estar expuestos por inhalación, ingestión o contacto con la piel. La OTA fue clasificada como posible carcinógeno humano en el grupo 2B por la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer, además, es nefrotóxica, hepatotóxica, neurotóxica, mutagénica, teratogénica, embriotóxica e inmunotóxica [7, 8, 9, 10, 11, 12, 13]. El hígado es el principal órgano responsable de la biotransformación de OTA donde se pueden formar metabolitos tóxicos, lo que provoca la hepatotoxicidad. La OTA demostró que es hepatotóxica, por esta razón, en varios estudios se utilizan las células HepG2 que derivan del carcinoma hepatocelular humano [9, 13].

Estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, sugieren que la toxicidad de la OTA puede estar relacionada con la estimulación del estrés oxidativo. Los daños oxidativos mediados por OTA a nivel celular, se relacionan con la peroxidación lipídica, daño a las proteínas, también daño al ADN, que incluye principalmente roturas de las cadenas simple y doble, lesiones en las bases, como es la formación de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), así como inhibición de la síntesis de RNA y proteínas [2, 12, 13]. La inhibición de la síntesis de proteínas provoca una disminución de la proliferación celular y apoptosis. Investigaciones sobre el mecanismo de apoptosis sugieren que OTA ingresa a las células a través de transportadores OAT1 y OAT3 y que puede desencadenar la apoptosis por vía mitocondrial y retículo endoplasmático [2, 7, 10].

En relación a estudios de la citotoxicidad de OTA *in vitro*, se muestra el empleo de diferentes metodologías en las pruebas citotóxicas, al igual que tiempos de exposición de 24, 48 y 72 horas y rangos de concentraciones de OTA, que van desde 0; 0,1; 2,5; 5; 10; 20; 40; 50; 64 μM hasta 128 μM , así como

la utilización de diversas líneas celulares como HepG2, NRK-52E (células del túbulo proximal renal de rata), Vero-E6 (células de riñón del mono verde), hPBMC (células mononucleares de sangre periférica, GCs (células granulosa de ovario porcino), GC-2 (células germinales masculinas), SH-SY5Y (células del neuroblastoma humano), Caco-2 (células de colon humano), evidenciándose en las líneas celulares probadas una disminución de la viabilidad celular menor del 50 % a mayor concentración OTA en comparación con el control [2, 11, 12, 13, 15, 16, 17].

Así mismo, se reportan concentraciones inhibitorias (CI_{50}) de OTA para HepG2 de 52,62 $\mu\text{M} \pm 0,04$ a las 48 horas y de 36 $\mu\text{M} \pm 0,09$ a las 72 horas de tratamiento, en otros estudios se registran CI_{50} de 21,16 μM y de 27 μM durante 24 horas de tratamiento para esta línea celular, mientras que para otras líneas celulares como Caco-2 la CI_{50} fue de 7,63 μM con 72 horas de tratamiento [10, 11, 18]. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue estimar los efectos tóxicos de la OTA en la línea celular HepG2 mediante la inhibición de la proliferación celular, determinar los cambios morfológicos en las células y su correlación con la apoptosis.

2. Métodos y Materiales

Micotoxina. A partir del estándar de la Ochratoxina A suspendida en metanol (HPLC-OTA), Micotox Ltda, Colombia, se procedió a la liofilización por 24 horas. En síntesis, consistió en la diálisis de la micotoxina OTA en tampón Tris a 25 mM por 24 horas, a continuación, el contenido se transfirió a un tubo Falcon, se congeló por 4 horas y se finalizó con la liofilización.

Células HepG2. A partir de viales congelados de la línea celular HepG2 (carcinoma de hepatoblastoma humano), se realizaron cultivos hasta alcanzar una confluencia del 80%. Seguidamente, se dissociaron los cultivos con tripsina 0,25% y se sembraron en placas a una concentración de 20.000 células/100 μl por pozo de RPMI-1640 complementado con suero fetal bovino al 10 % y con una solución de antibiótico al 0,05 %, las placas se incubaron por 24 horas para la adhesión celular; finalizado este tiempo se agregó la micotoxina OTA diluida DMSO (dimetilsulfóxido) a concentraciones de 1; 2,5; 5,0; 10 y 15 μM [19].

Propagación de las células HepG2. La citotoxicidad de la micotoxina OTA, se calculó por el método colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio) para determinar la viabilidad celular. Después de intervalos de 48 y 72 horas de tratamiento con OTA, se añadió 100 μl de MTT (0,5 mg/ml) y se incubó por 4 horas con las siguientes condiciones de cultivo: 37 °C, 5 % CO_2 y 95 % de humedad. A continuación, los cultivos se lavaron con tampón fosfato salino (PBS), y seguidamente, se agregaron 100 μl de isopropanol ácido en agitación suave por

5 minutos para solubilizar los cristales de Formazán durante 15 minutos. Por último, se procedió a medir la densidad óptica a 570 nm (espectrofotómetro Tecan Spectra classic) de la solución solubilizada [20] y se determinó el porcentaje de viabilidad celular. La citotoxicidad de OTA sobre las células HepG2, se trabajó como porcentaje de inhibición [19].

Para calcular la concentración inhibitoria (CI_{50}), se analizaron las curvas de inhibición de porcentaje y de concentración, es decir, la concentración de OTA necesaria para inhibir el 50% del crecimiento en las células de HepG2. Usando el método de regresión no lineal tomando como variable de respuesta la dosis inhibitoria y como variable de regresión la concentración de OTA [21].

Microscopía electrónica de transmisión. Se inició con un cultivo a una concentración de 3×10^6 células HepG2 por 24 horas para permitir la adhesión celular, se trató $10 \mu\text{M}$ de OTA por un periodo 48 horas. Transcurrido el tiempo de tratamiento, el monocapa celular se disoció con tripsina al 0,25%, inmediatamente se lavó la suspensión celular con PBS y se centrifugó por 10 minutos a 2.000rpm. A continuación, en una mezcla 3:3 de glutaraldehído-formaldehído al 3% en tampón cacodilato 0,1M y pH 6,3, se fijó el precipitado celular por un periodo máximo de 2 horas, después, se centrifugó a 2.000 rpm por 10 minutos y se lavó con tampón cacodilato y se postfijó por un intervalo de tiempo de 3 a 12 horas en una solución de tetraóxido de osmio al 1% en tampón cacodilato. Terminado el lapso, nuevamente se lavó con solución tampón y se deshidrató en concentraciones ascendentes de alcohol etílico finalizando con óxido de propileno; en seguida, se infiltró e incluyó en resina epoxídica. De las células incluidas se realizaron cortes de secciones ultrafinas de 90 nm de espesor, las cuales fueron contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo para la observación de las características morfológicas de la apoptosis en el microscopio electrónico de transmisión (H-7000, Hitachi) [19].

Análisis estadístico. Se efectuó empleando el programa GraphPad Prism, los datos se analizaron con análisis de varianza (ANOVA) de una vía y utilizando el método de Dunnett's. Esto con el fin de comparar las diferencias significativa entre el control y los grupos de células HepG2 tratada con las distintas concentraciones de OTA a las 48 y 72 horas. Se realizaron 3 ensayos independientes, cada concentración de OTA y su respectivo control se trabajaron por triplicado.

3. Resultados y Discusión

Citotoxicidad de OTA sobre la propagación de las células HepG2. Para estimar la inhibición de la proliferación en las células HepG2 por parte de la OTA, las células HepG2 fueron tratadas a diferentes concentraciones de 1; 2,5; 5,0; 10 y $15 \mu\text{M}$ de OTA, a dos intervalos de tiempo de 48 y 72 horas.

Con el tratamiento por 48 horas, se evidenció disminución de la proliferación celular en las células HepG2 desde la concentración de $2,5 \mu\text{M}$ hasta los $15 \mu\text{M}$. La disminución de la proliferación celular estuvo marcada por una dependencia de la concentración, por lo que, al aumentar la concentración de OTA, la proliferación celular se redujo significativamente desde un 89,74 % $DE \pm 1,7$ hasta 31,99 % $DE \pm 0,0$, en contraste con el control (97,88 % $DE \pm 0,4$), con un valor $p < 0,0001$. Así mismo, en las concentraciones de 10 y $15 \mu\text{M}$ de OTA la proliferación de las células HepG2 se registró por debajo del 50 % (Figura 2).

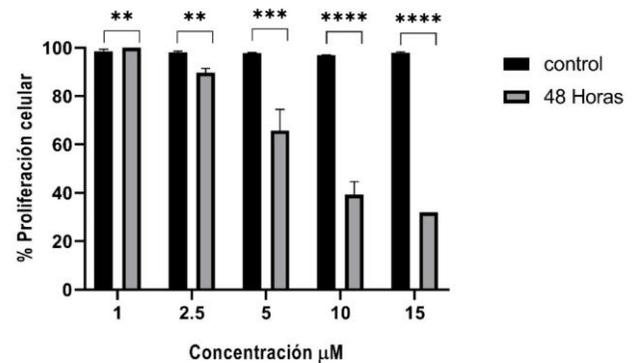


Figura 2. Efecto de la OTA sobre proliferación celular en las células HepG2. La proliferación se evaluó por el método de reducción de MTT, con distintas concentraciones de OTA (1; 2,5; 5,0; 10 y $15 \mu\text{M}$) por 48 horas, Cada barra representa la media $DE \pm$ ($n=3$) **** $p < 0,0001$ versus el control usando ANOVA.

De forma similar, se observó una disminución significativa en la proliferación celular de HepG2 con el tratamiento con OTA por 72 horas a partir de la concentración de $2,5 \mu\text{M}$ hasta los $15 \mu\text{M}$ de OTA (Figura 3). La proliferación celular se redujo significativamente con dependencia de la concentración desde un 90,42 % $DE \pm 2,6$ hasta 24,23 % $DE \pm 0,1$ a diferencia del control (97,07 % $DE \pm 1,87$), respectivamente ($p < 0,001$). Lo mismo que en el intervalo de 48 horas, se halló que la proliferación celular disminuyó por debajo del 50 % a las concentraciones de 10 y $15 \mu\text{M}$ de OTA. Por otro lado, se encontró que la citotoxicidad de OTA también es dependiente del tiempo de exposición. La CI_{50} a las 48 horas de exposición a OTA mostró un resultado de $9,19 \mu\text{M}$ $DE \pm 0,68$ y a las 72 horas de exposición a OTA la CI_{50} fue de $9,98 \mu\text{M}$ $DE \pm 0,43$. Por lo tanto, la concentración mínima para inhibir el 50 % de las células HepG2 a las 72 horas fue mayor que la de 48 horas de tratamiento con OTA.

Teniendo en cuenta los resultados de citotoxicidad anteriores, se evidenció que disminuye la propagación de las células HepG2 de hasta el 31,99 % $DE \pm 0,0$ y hasta 24,23 % $DE \pm 0,1$ a la concentración de $15 \mu\text{M}$ de OTA a las 48 y 72 horas de tratamiento, respectivamente. Este reporte coincide con estudios en que se observó una dependencia del tiempo y de la concentración de OTA en un rango de 0,1 a $10 \mu\text{M}$ [13] también se registró reducción de la viabilidad de estas células

en comparación con el control a concentraciones de 25, 30, 50 y 75 μM OTA durante 24 horas [9,16,18]. Otros estudios que utilizaron un rango de concentración de OTA desde los 5 μM hasta los 100 μM para evaluar el estrés oxidativo, encontraron un aumento de las especies reactivas de oxígeno en las células HepG2 de una manera dependiente del tiempo [2,13].

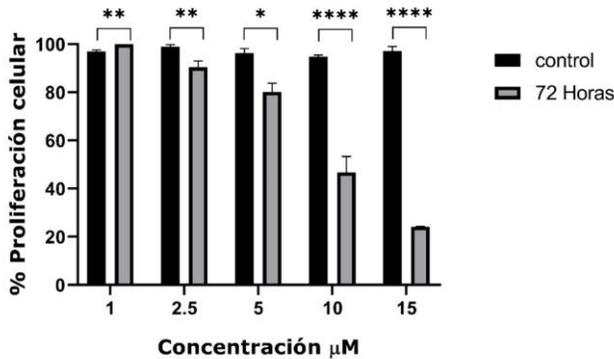


Figura 3. Efecto de la OTA sobre proliferación celular en las células HepG2, con distintas concentraciones de OTA (1; 2,5; 5,0; 10 y 15 μM) por 72 horas. Cada barra representa la media $\text{DE} \pm (n=3)$ **** $p < 0,0001$ versus el control usando ANOVA.

En cuanto a la inhibición del 50 % de la población celular, los valores de la CI_{50} de 9,19 μM $\text{DE} \pm 0,68$ y 9,98 μM $\text{DE} \pm 0,43$ a las 48 y 72 horas de exposición de las células HepG2, indican que son dependientes del tiempo. Estos resultados difieren de investigaciones donde la CI_{50} es de 21,16 μM hasta 210 μM para células HepG2 con un tiempo de 72 y 24 horas de tratamiento con OTA, respectivamente [8,10]. Así mismo, otras investigaciones obtienen una CI_{50} de 52,62 μM y 36 μM de OTA sobre células HepG2 a las 48 y 72 horas [11] y de 25 μM a las 24 horas de tratamiento de estas células con OTA [18].

En estudios anteriores, se demostró que la propagación de las células HepG2 se redujo con el tratamiento de la OTA con dependencia del tiempo de exposición y de la concentración de OTA, coincidiendo con los resultados obtenidos en este trabajo. Como también se describe que es posible que la OTA interfiera significativamente con el metabolismo energético de las células, puesto que el ensayo colorimétrico MTT mide la función de enzimas mitocondriales que participan en la producción del ATP; conforme a esto, estudios en otras células como del epitelio gástrico humano (GES-1) reveló un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno, pérdida del potencial de membrana en las mitocondrias y decrecimiento en la concentración de ATP, y su posible activación de la apoptosis [22]. Finalmente, cabe anotar que los estudios sobre la toxicidad de la OTA en líneas celulares pueden presentar diferencias en los valores de proliferación celular y CI_{50} por los procedimientos experimentales, el metabolismo celular que está asociado a la naturaleza de la célula y los tiempos de exposición de las células a la OTA; es claro que la OTA genera disminución de la proliferación

celular como lo muestran los resultados obtenidos, por lo tanto, se requiere realizar estudios que analicen otras características más específicas de las células que conlleven a esclarecer los mecanismos que alteran la proliferación y viabilidad celular.

Cambios morfológicos de las células HepG2. Al analizar por microscopía electrónica de transmisión las características morfológicas propias del proceso de apoptosis en las células HepG2 tratadas con 10 μM de OTA por 48 horas, se observaron cambios morfológicos en estas células en comparación con el control (Figura 4A y B). En las células HepG2 sometidas al tratamiento con OTA se presentó alteración en la morfología celular, además fragmentación nuclear, celular y formación de cuerpos apoptóticos características de la apoptosis (Figura 4B), mientras que en las células HepG2 sin tratamiento, se distinguen células con morfología epitelial delimitada por su membrana plasmática en contacto con otras células, con el núcleo redondeado delimitado por su membrana nuclear y la presencia de nucléolos (Figura 4A). Estos resultados mostraron que la citotoxicidad de OTA sobre las células HepG2, se puede relacionar con la muerte celular apoptótica. Además, estas evidencias concuerdan con estudios donde la OTA induce apoptosis con los respectivos cambios morfológicos que ocurren en las células. Así, la investigación sobre células de riñón porcino PK-15 arrojó un aumento significativo de las células apoptóticas con una dependencia de las dosis de OTA en un rango de concentración de 2 a 8 μM de OTA durante 48 horas [23]. Otros estudios en células HepG2 y línea celular de epitelio de riñón canino MDCK reportan que al aumentar la concentración hasta 50 μM de OTA durante 24 horas, el número de células disminuyó y se mostró una desorganización de las estructuras intracelulares que sugieren el inicio del proceso apoptótico en MDCK [24]. Así mismo, en células GC-2, línea celular similar a un espermatozoido, se observaron cambios morfológicos relacionados con la apoptosis y que el número de células apoptóticas incrementó con el aumento de la concentración de OTA [14]. Además, diversos estudios sobre los efectos de OTA exhibieron un aumento de células HepG2 apoptóticas [25].

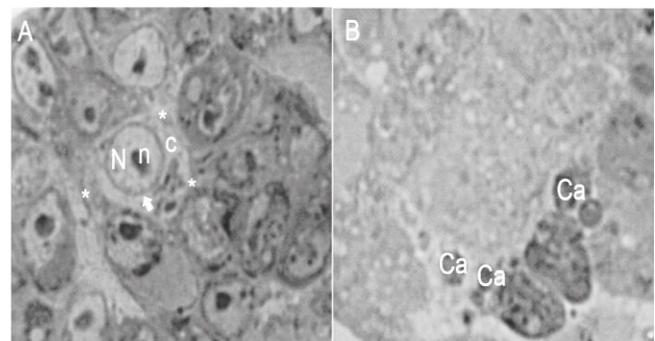


Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión de las células HepG2, expuestas por 48 horas a 10 μM de OTA. A. control negativo, B. Células expuestas a 10 μM de OTA. Aumento 4.000X. *: Membrana plasmática, c:

Contenido celular, N: Núcleo, n: nucléolo, Ca: Cuerpos apoptóticos, flecha: membrana nuclear.

4. Conclusiones

En este estudio, se observaron efectos tóxicos de la micotoxina OTA en la proliferación de la línea celular HepG2, incluso a concentraciones inferiores a 15 μM . Los resultados revelan una inhibición de la proliferación celular del 50% a una concentración inhibitoria de 9.58 μM de OTA, acompañada de notables cambios en la morfología celular. Estos cambios morfológicos, que incluyen la fragmentación tanto nuclear como celular, culminan en la formación de cuerpos apoptóticos, sugiriendo un proceso de muerte celular por apoptosis inducido por OTA.

Es importante destacar que en los estudios de toxicidad de la micotoxina OTA en líneas celulares, es común observar variaciones en los valores de proliferación celular y CI_{50} debido a las diferencias en los procedimientos experimentales, el metabolismo celular asociado a la naturaleza de las células y los tiempos de exposición a la OTA. Los resultados obtenidos claramente indican que la OTA provoca una disminución significativa en la proliferación celular.

Sin embargo, para comprender completamente los mecanismos que subyacen a esta alteración en la proliferación y viabilidad celular, es necesario llevar a cabo investigaciones adicionales que analicen aspectos específicos de las células. Estos estudios futuros pueden arrojar luz sobre los detalles fundamentales de cómo la OTA afecta a las células, lo que en última instancia contribuirá a una comprensión más completa de su impacto en la modificación de la fisiología celular.

5. Agradecimientos.

A Vicerrectoría de investigaciones de la Universidad de Pamplona por la subvención del proyecto. Asimismo, al CME (Centro de Microscopía Electrónica) "Dr. Ernesto Palacios Prú" y al IDIC (Instituto de Inmunología Clínica), Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, por su apoyo y colaboración en el desarrollo de la investigación.

Conflictos de intereses: El manuscrito fue desarrollado, preparado y revisado con la participación de todos los autores, quienes declaramos que no existe ningún conflicto de intereses que ponga en riesgo la validez de los resultados presentados.

Financiación: Este estudio fue financiado por la Universidad de Pamplona. Norte de Santander. Colombia.

Referencias

- [1] A. Ravelo, C. Rubio Armendáriz, and A. J. Gutiérrez Fernández, "La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión," *Nutrición Hospitalaria*, vol. 26, no. 6, pp. 1215-1226, 2011. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5381>
- [2] Y. Tao, S. Xie, F. Xu, A. Liu, Y. Wang, D. Chen, Y. Pan, L. Huang, D. Peng, X. Wang, and Z. Yuan, "Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 112, pp. 320-331, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
- [3] W. Chen, C. Li, B. Zhang, Z. Zhou, Y. Shen, and X. Liao, "Advances in Biodegradation of Ochratoxin A-A Review of the Past Five Decades," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, p. 1386, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01386>
- [4] H. A. Serrano and N. Cardona, "Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos," *Revista CES Medicina*, vol. 29, no. 1, pp. 143-152, 2015.
- [5] X. Zhang, C. Boesch, Y. Lou, S. Wolfram, P. Huebner, and G. Himbach, "Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells," *Genes & Nutrition*, vol. 4, no. 1, pp. 41-48, 2009. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s12263-008-0109-y>
- [6] A. H. Heussner and L. E. H. Bingle, "Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data," *Toxins*, vol. 7, no. 10, pp. 4253-4282, 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>
- [7] X. Qi, L. Zhu, B. Yang, H. Luo, W. Xu, X. He, and K. Huang, "Mitigation of cell apoptosis induced by ochratoxin A (OTA) is possibly through organic cation transport 1 (OCT1) knockout," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 121, pp. 15-23, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.026>
- [8] L. Gayathri, R. Dhivya, D. Dhanasekaran, V. S. Periasamy, A. A. Alshatwi, and M. A. Akbarsha, "Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 83, pp. 161-163, 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.06.009>
- [9] A. C. González, S. Marín, A. E. Rojas-García, V. Sanchis, and A. J. Ramos, "UPLC-MS/MS analysis of ochratoxin A metabolites produced by Caco-2 and HepG2 cells in a co-culture system," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 109, pp. 333-340, 2017. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.011>
- [10] C. S. Madalena, M. A. Faria, S. C. Cunha, and I. M. P. L. V. Ferreira, "Toxicological interactions between mycotoxins from ubiquitous fungi: Impact on hepatic and intestinal human epithelial cells," *Chemosphere*, vol. 202, pp. 538-548, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.122>
- [11] G. A. Juan, J. Tolosa, C. Juan, and M. J. Ruiz, "Cytotoxicity, genotoxicity and disturbance of cell cycle in HepG2 cells exposed to OTA and BEA: Single and combined actions," *Toxins*, vol. 11, no. 6, p. 341, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/toxins11060341>
- [12] T.-Y. Zhang, L. Kong, J.-X. Hao, H. Wang, Z.-H. Yan, X.-F. Sun, and W. Shen, "Effects of Ochratoxin A exposure on DNA damage in porcine granulosa cells in vitro," *Toxicology Letters*, vol. 330, pp. 167-175, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.05.011>
- [13] P. E. García, D. Ryu, C. Lee, and H. Lee, "Ochratoxin A Induces Oxidative Stress in HepG2 Cells by Impairing the Gene Expression of Antioxidant Enzymes," *Toxins*, vol. 13, no. 4, p. 271, 2021. [Online]. Available: <https://doi.org/10.3390/toxins13040271>
- [14] R. Chen, L. Deng, X. Yu, X. Wang, L. Zhu, T. Yu, Y. Zhang, B. Zhou, W. Xu, L. Chen, and H. Luo, "MiR-122 partly mediates the ochratoxin A-induced GC-2 cell apoptosis," *Toxicology in Vitro Journal*, vol. 30, pp. 264-273, 2015. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.10.011>
- [15] Y. Chen, H. Wang, N. Zhai, C. Wang, K. Huang, and C. Pan, "Nontoxic concentrations of OTA aggravate DON-induced intestinal barrier dysfunction in IPEC-J2 cells via activation of NF- κ B signaling pathway," *Toxicology Letters*, vol. 311, pp. 114-124, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.04.021>
- [16] A.-M. Domijan, A. Marjanović Čermak, A. Vulić, I. Bujak Tartaro, I. Pavičić, J. Pleadin, K. Markov, and B. Mihaljević, "Cytotoxicity of gamma irradiated aflatoxin B1 and ochratoxin A," *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 54, no. 3, pp. 155-162, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1080/03601234.2018.1536578>

- [17] G. A. Juan, S. Carbone, M. Ben-Mahmoud, G. Sagratini, and J. Mañes, "Beauvericin and ochratoxin A mycotoxins individually and combined in HepG2 cells alter lipid peroxidation, levels of reactive oxygen species and glutathione," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 139, p. 111247, 2020. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111247>
- [18] J. Zhao, X. Qi, Q. Dai, X. He, H. Dweep, M. Guo, Y. Luo, N. Gretz, H. Luo, K. Huang, and W. Xu, "Toxicity study of ochratoxin A using HEK293 and HepG2 cell lines based on microRNA profiling," *Human and Experimental Toxicology*, vol. 36, no. 1, pp. 8-22, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1177/0960327116632048>
- [19] H. Garzón, N. Jaimes, S. Salmen, and M. Gil, "Efecto citotóxico de Deoxinivalenol sobre la proliferación de la línea celular HepG2," in *MVZ Córdoba, Colombia*, 2016, vol. 26, no. 3, pp. 1-7. [Online]. Available: <https://doi.org/10.21897/rmvz.2080>
- [20] L. Kupcsik, "Estimation of Cell Number Based on Metabolic Activity: The MTT Reduction Assay," in *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, United States, 2011, vol. 740, pp. 13-19. [Online]. Available: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_3
- [21] N. Jaimes, S. Salmen, M. C. Colmenares, A. E. Burgos, L. Tamayo, R. V. Mendoza, and A. Cantor, "Efecto citotóxico de los compuestos de inclusión de paladio (II) en la beta-ciclodextrina," *Biomédica*, vol. 36, no. 4, pp. 603-611, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i4.2880>
- [22] Q. Li, Z. Dong, W. Lian, J. Cui, J. Wang, H. Shen, W. Liu, J. Yang, X. Zhang, and H. Cui, "Ochratoxin A causes mitochondrial dysfunction, apoptotic and autophagic cell death and also induces mitochondrial biogenesis in human gastric epithelium cells," *Archives of Toxicology*, vol. 93, no. 4, pp. 1141-1155, 2019. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02433-6>
- [23] G. Qian, D. Liu, L. Hou, M. Hamid, X. Chen, F. Gan, S. Song, and K. Huang, "Ochratoxin A induces cytoprotective autophagy via blocking AKT/mTOR signaling pathway in PK-15 cells," *Food and Chemical Toxicology*, vol. 122, pp. 120-131, 2018. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.09.070>
- [24] N. Sali, S. Nagy, M. Poór, and K. Tamás, "Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation," *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, vol. 79, pp. 45-54, 2016. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.01.004>
- [25] J. Capraro and F. Rossi, "The effects of ochratoxin A on liver metabolism," *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 5, pp. 177-185, 2012. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1007/s12349-012-0101-3>

BORRADOR. En revisiones finales.