

## MICOTOXINAS EN ALIMENTOS: EVALUACIÓN DEL DAÑO CROMOSÓMICO INDUCIDO POR OCHRATOXINA A EN DOS MODELOS EXPERIMENTALES *IN VITRO*

JC De Luca, A Seoane

Instituto de Genética Veterinaria IGEVET-CCT-La Plata-  
CONICET-UNLP "Ing. Fernando Noel Dulout"  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

**RESUMEN:** El objetivo del presente estudio consistió en evaluar la inducción de alteraciones cromosómicas por la micotoxina Ocratoxina A (OTA). Se analizó la inducción de Aberraciones Cromosómicas Estructurales (ACE) e Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) en linfocitos de cerdo, así como la inducción de aneuploidía mediante el ensayo anafase-telofase en células CHO (Chinese Hamster Ovary Cells). Se ensayaron tres dosis de esta sustancia: 0,25; 0,50; 1,00 µg/ml. El análisis citogenético reveló un aumento significativo en la frecuencia de fracturas de monocromátida ( $p < 0.01$ ) respecto del control. En el caso de los ICH no se observaron diferencias significativas respecto del control ( $p > 0.05$ ). La frecuencia de cromosomas y fragmentos rezagados inducidos por las tres dosis de ocratoxina A no se incrementó en forma significativa ( $p > 0.05$ ), mientras que la frecuencia de puentes de cromatina se incrementó levemente, encontrándose en el límite de significancia. Por otra parte, la acción citotóxica de la OTA resultó tan importante como la genotóxica en el rango de dosis utilizadas. En base a los antecedentes antes mencionados y los resultados obtenidos, podría sugerirse que la acción carcinogénica de esta sustancia se debería más a mecanismos epigenéticos que genéticos.

**Palabras clave:** micotoxinas, ocratoxina A, aberraciones cromosómicas, linfocitos de cerdo, ensayos *in vitro*

## MYCOTOXINS IN FOOD: ASSESSMENT OF CHROMOSOMAL DAMAGE INDUCED BY OCHRATOXIN A IN TWO *IN VITRO* EXPERIMENTAL MODELS

**ABSTRACT:** The objective of the present study was to analyze the induction of chromosome aberrations by the mycotoxin ochratoxin A (OTA). The frequency of structural chromosome aberrations (SCA) and sister chromatid exchanges (SCE) in pig lymphocytes, as well as the induction of aneuploidy by means of the anaphase-telophase test in CHO (Chinese Hamster Ovary Cells) cells was evaluated. Three doses of OTA were tested: 0,25; 0,50; 1,00 µg/ml. The cytogenetic analysis of pig lymphocytes showed only a significant increase in the frequency of monochromatid breaks in relation with control group ( $p < 0.01$ ). On the other hand no significant differences for SCE were observed ( $p > 0.05$ ). The frequencies of lagging chromosomes and fragments induced by the three tested doses of OTA were not increased in significant form respect to the controls ( $p > 0,05$ ), and the frequency of chromatin bridges was increased slightly, being in the significance limit. In addition, the based on the above background and the results obtained could suggest that the carcinogenic action of OTA should be more epigenetic mechanisms than genetic.

**Key words:** Mycotoxins, Ochratoxin A, Chromosome Aberrations, Pig Lymphocytes, *In Vitro* tests.

Fecha de recepción: 29/08/07

Fecha de aprobación: 29/12/07

**Dirección para correspondencia:** Julio Cesar De Luca. Instituto de Genética Veterinaria (IGEVET) CONICET-UNLP "Ing. Fernando Noel Dulout". Facultad de Ciencias Veterinarias. CC 296 B1900AVW La Plata, Argentina.  
**E-mail:** [jdeluca@fcv.unlp.edu.ar](mailto:jdeluca@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

Existen varios tipos de hongos que bajo determinadas condiciones de temperatura y humedad pueden crecer en los ambientes de almacenamiento, transporte o procesamiento de los granos provocando su contaminación con toxinas (1). Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos que no son indispensables para su crecimiento y desarrollo. Son compuestos de bajo peso molecular que presentan una variada estructura química y propiedades biológicas (1). Pueden ocasionar cambios patológicos tanto en el hombre como en diferentes especies animales, por ejemplo: inmunotoxicidad, mutagénesis, teratogénesis, carcinogénesis, toxicidad renal y neurotoxicidad entre otras (2). Los géneros *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* son los tres más importantes productores de micotoxinas que afectan tanto a la salud humana como a la animal (3).

Dado que se ha encontrado un gran número de estos metabolitos como contaminantes de productos agrícolas, las micotoxinas han sido objeto de diferentes tipos de estudios debido no sólo a su impacto en la salud humana sino además en la producción animal y en la comercialización de productos alimenticios. En los últimos años se han publicado revisiones acerca de los efectos fisiológicos de las micotoxinas en diferentes especies de animales domésticos (4 y 5). Así también se ha estimado que el impacto de las micotoxinas en la industria alimenticia y ganadera provoca pérdidas económicas importantes. Por ejemplo, en el caso de Estados Unidos y Canadá estas pérdidas alcanzaron unos 5 billones de dólares (6).

La Ocratoxina A (OTA) es una micotoxina clorofenólica frecuente en alimentos (Figura I). Si bien su aislamiento se produjo a partir del hongo *Aspergillus ochraceus* (7), el principal productor de Ocratoxina A (OTA) en los países templados es *Penicillium verrucosum*, mientras que *Aspergillus spp.*, lo es en los países cálidos y tropicales (8-9). Si bien se atribuye a esta micotoxina ser al agente causal de la nefropatía endémica de los Balcanes (10), íntimamente relacionada con la nefropatía porcina, ha sido considerada como no genotóxica durante mucho tiempo debido a la obtención de resultados negativos o levemente positivos en los ensayos estándar que emplean organismos procariotas (11-12). Más recientemente se ha demostrado su potencial mutagénico en células de mamífero (13) y ha sido clasificada como un posible carcinógeno (categoría 2B por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, IARC) (14). El objetivo del presente trabajo consistió en evaluar la inducción de alteraciones cromosómicas por Ocratoxina A (OTA) empleando dos modelos experimentales diferentes: a) inducción de aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) e intercambios de cromátidas hermanas (ICH) en

linfocitos de cerdo y b) inducción de aneuploidía mediante el ensayo anafase-telofase en células CHO (Chinese Hamster Ovary Cells).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### COMPUESTO A ENSAYAR

Para la realización de los experimentos se utilizó Ocratoxina A (OTA) de máxima pureza (Sigma, St. Louis, MO, USA). Previo al análisis de la inducción de alteraciones cromosómicas, se evaluó el efecto citotóxico de la micotoxina. Para tal fin se ensayaron 6 dosis diferentes del compuesto: 0,25; 0,50; 1,00; 2,50; 5,00 y 10,00 µg/ml. Al mismo tiempo un cultivo al cual no se le agregó ocratoxina A se utilizó como control. Se eligieron las tres dosis más bajas debido a que a partir de 1 µg/ml la toxicidad del compuesto impidió el análisis de un número adecuado de células en división.

### INDUCCIÓN DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS DE CERDOS

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de cerdo provenientes de un matadero, las mismas se recogieron en frascos estériles con 1 ml de heparina. Los linfocitos se cultivaron con medio de cultivo Ham F10 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10 % de suero bovino fetal (Laboratorios Notocor, Córdoba, Argentina) y antibióticos (penicilina 50 UI y estreptomycin 50 µg/ml) (Bagó, Buenos Aires, Argentina). Como mitógeno se utilizó fitohemaglutinina (1 µg/ml) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA).

Se analizaron dos tipos de aberraciones cromosómicas: a) aberraciones cromosómicas estructurales (ACE) y b) intercambios de cromátidas hermanas (ICH). En el primer caso, las muestras se cultivaron en estufa a 37 °C durante 48 h. Para el análisis de ICH, el medio de cultivo fue suplementado con 5-bromodeoxiuridina y las muestras se cultivaron en estufa a 37 °C durante 72 h. En ambos casos los cultivos se realizaron siempre en presencia de OTA. La elección del tiempo para el análisis de ICH se realizó en base un estudio previo en el que se estableció la aparición de la mayor frecuencia de células en segunda división, etapa en la cual se estudia este tipo de alteración. Las preparaciones cromosómicas se realizaron de acuerdo con la técnica de secado al aire. Las mismas se tiñeron con el colorante de Giemsa al 5 %. El análisis citogenético se hizo a ciegas y fue realizado por un solo investigador. Para el conteo de ACE se realizaron tres repeticiones con sangre proveniente de diferentes animales y se contabilizaron 100 metafases por cada una de ellos y por cada dosis estudiada, es decir, un total de 300 células por punto experimental, excepto en los casos en los que el grado de cito toxicidad no lo permitió. El análisis estadístico se llevó a cabo

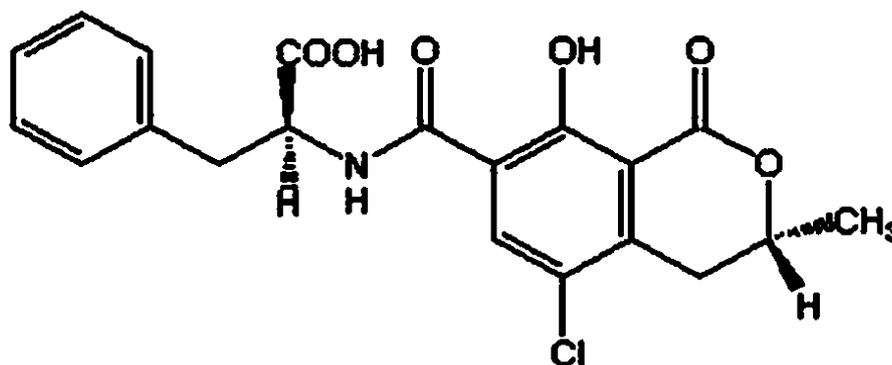


Figura I. Estructura química de la Ocratoxina A  
Figure I. Chemical structure of Ochratoxin A

Tabla 1. Aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por OTA en linfocitos de cerdos  
Table 1. OTA induced chromosomal aberrations in pig lymphocytes

Tratamiento	Células		Alteraciones cromosómicas (%)				
	analizadas	normales	LA	B'	B''	Dic	FR
Control	300	294	1,00	0,33	0,33	0,00	0,33
0,25 µg/ml	306	283	0,98	2,29	0,98	1,63	1,63
0,50 µg/ml	293	273	0,00	3,41	1,71	1,37	0,34
1,00 µg/ml	206	191	0,49	3,88	0,49	0,97	1,46

LA: lesiones acromáticas; B': fracturas de monocromátida; B'': fracturas de isocromátida; Dic: cromosomas dicéntricos; FR: fragmentos cromosómicos

mediante la prueba de  $\chi^2$  con ajuste de Yates. Para el caso de ICH se analizaron entre 25 y 50 metafases en segunda división por animal y dosis estudiada. En este caso, el análisis estadístico se hizo mediante la prueba "U" de Mann-Whitney.

### INDUCCIÓN DE ALTERACIONES EN ANAFASE-TELOFASE DE CÉLULAS CHO

Para llevar a cabo este estudio se emplearon fibroblastos procedentes de una línea celular establecida (CHO) originaria de hamster chino (*Cricetulus griseus*). Las células se cultivaron en monocapa sobre cubreobjetos de 24 x 36 mm, en cápsulas de Petri de 37 °C, con una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub> durante 28-30 h. El medio de cultivo empleado fue Ham F10, suplementado con 10 % de suero bovino fetal. El agregado de la droga se realizó cuando las células estaban en fase logarítmica de crecimiento, 8 horas antes del sacrificio. Una vez cumplido el tiempo de cultivo, las células se sometieron a una fijación gradual con alcohol metílico-ácido acético en proporción 3:1, de acuerdo con el siguiente procedimiento: 5 ml de fijador + 5 ml de medio de cultivo durante 10 min, descarte de la mezcla y agregado de 10

ml de fijador fresco durante 10 min y conservación a 4°C durante 24 h. Las células se tiñeron con carbol fucsina, previo pasaje por una batería de alcohol etílico (100% - 70% - 70% - agua). Finalmente las preparaciones se montaron sobre portaobjetos y se analizaron en microscopio óptico (siempre por un solo investigador y a ciegas).

Se analizaron 300 células en el estadio de anafase-telofase por cada dosis estudiada, excepto para la dosis más alta en la que sólo se pudieron contabilizar 22 células en el estadio antes mencionado. La prueba estadística utilizada fue G de Sokal y Rohlf.

### RESULTADOS

La Tabla 1 resume los resultados obtenidos con respecto a la inducción de aberraciones cromosómicas estructurales. En un primer análisis se comparó el total de ACE inducidas por cada tratamiento con respecto al control, comprobándose que todos los tratamientos incrementaron de forma significativa la frecuencia de ACE ( $p < 0.01$ ). Posteriormente se realizó el análisis estadístico individual de cada una de las aberraciones cromosómicas analizadas. En este caso se observó que sólo la frecuencia de fracturas de monocromátida se incrementó significativamente respecto

Tabla 2. Intercambios de cromátidas hermanas (ICH) inducidos por OTA en linfocitos de cerdos  
Table 2. OTA induced sister chromatid exchanges (SCE) in pig lymphocytes

Tratamiento	Células analizadas	Total ICH	ICH/Cel. ± SD
Control	127	634	4,99 ± 1,62
0,25 µg/ml	150	549	3,66 ± 1,76
0,50 µg/ml	150	648	4,32 ± 1,75
1,00 µg/ml	125	647	5,17 ± 2,87

Total ICH: Total de intercambios de cromátidas hermanas observados; ICH/Cel. ± SD: Promedio de intercambios de cromátidas hermanas por cada célula ± el desvío standard.

Tabla 3. Alteraciones cromosómicas en anafase-telofase inducidas por OTA en células CHO  
Table 3. OTA induced anaphase-telophase alterations in CHO cells

Tratamiento	Alteraciones cromosómicas (%)			Células analizadas	Índice mitótico
	P	CR	FR		
Control	0,33	0,67	0,67	300	35
0,25 µg/ml	1,00	1,00	0,33	300	22
0,50 µg/ml	0,33	1,00	0,33	300	13
1,00 µg/ml	9,09	4,55	4,55	22	6

P: células con puentes; CR: células con cromosomas rezagados; FR: células con fragmentos

del control ( $p < 0.01$ ). La frecuencia de cromosomas dicéntricos, mostró diferencias levemente significativas ( $p < 0.05$ ) respecto del control con las tres dosis utilizadas.

La Tabla 2 muestra los resultados obtenidos con respecto a la inducción de ICH. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre el grupo control y las tres dosis ensayadas.

La Tabla 3 resume los resultados obtenidos a partir del ensayo de anafase-telofase en células CHO. La prueba estadística utilizada reveló que las frecuencias de cromosomas y fragmentos rezagados inducidos por las tres dosis de Ocratoxina A ensayadas no se incrementaron en forma significativa respecto de los controles ( $p > 0.05$ ). Por otra parte la frecuencia de puentes de cromatina se incrementó levemente, encontrándose en el límite de significancia.

## DISCUSIÓN

A pesar que la IARC ha clasificado a la OTA como un posible carcinógeno humano (grupo 2B) (14), la evidencia existente con respecto a su capacidad genotóxica es todavía polémica, lo cual hace difícil justificar las restricciones de esta sustancia.

Algunos investigadores han encontrado resultados negativos acerca de la capacidad genotóxica de este compuesto y argumentan que la misma no puede ser la causa de la acción carcinogénica observada en roedores. En este sentido se ha reportado que la formación de aductos en el ADN no es clara, ya que no se han encontrado uniones OTA-ADN (15-16). Por otra parte otros

estudios revelaron la capacidad de la OTA de generar aductos en la molécula del ADN, así como también la inducción de daño oxidativo, lo cual revelaría la capacidad genotóxica y carcinogénica de esta toxina (17). Además se ha podido comprobar la capacidad de este compuesto de inducir intercambios de cromátidas hermanas en linfocitos humanos y en células epiteliales porcinas (18-19) y aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos de bovinos (20) y humanos (21-22). Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan una escasa capacidad clastogénica de la OTA en linfocitos de cerdo, ya que sólo se observaron aumentos significativos en lo que respecta a la inducción de fracturas de monocromátida. No se comprobaron aumentos significativos en la frecuencia de cromosomas dicéntricos ni de ICH.

El ensayo de anafase-telofase en células CHO, puede ser considerado válido para el estudio de aneuploidía, presentando la ventaja de ser muy sencillo y rápido ya que no requiere un recuento cromosómico (23). Del mismo modo que el análisis de aberraciones cromosómicas en linfocitos reveló una escasa capacidad clastogénica de la OTA, los resultados obtenidos a partir del ensayo de anafase-telofase revelaron una escasa capacidad clastogénica de esta sustancia en células CHO y no revelaron la existencia de efecto aneugénico. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Knasmüller y colaboradores (24) quienes comprobaron la capacidad de OTA de inducir micronúcleos en células HepG2 que se originarían a partir de roturas cromosómicas y no de cambios numéricos. Es importante destacar

que en los modelos experimentales utilizados la dosis más alta (1 µg/ml) mostró un claro efecto citotóxico. Este hecho se pone de manifiesto en la disminución del número de células analizadas y permitiría sugerir que la acción citotóxica de OTA sería tan importante como la genotóxica en el rango de dosis utilizadas.

Por lo tanto en base a los antecedentes antes mencionados y los resultados obtenidos, podría sugerirse que la acción carcinogénica de esta sustancia se debería más a mecanismos epigenéticos que genéticos.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias a los siguientes subsidios: PICT 14329 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, PIP 5583 del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), proyecto 11-V138 de la Universidad Nacional de La Plata. Los autores son miembros de la Carrera de Investigador del CONICET.

## BIBLIOGRAFÍA

- Haschek WM, Voss KA, Beasley VR. Selected mycotoxins affecting animal and human health, in *Handbook of Toxicologic Pathology*, 2nd ed.; Haschek, W. M., Roussex, C.G., Wallig, M. A., Eds., Academic Press: New York, 2002; p. 645-698.
- O'Brien E and Dietrich D. Ochratoxin A: the continuing enigma. *Critical Rev in Toxicol* 2005; 35: 33-60.
- Moss MO. Mycotoxic fungi. In *Microbial Food Poisoning*, 2nd ed., Eley, A. R., Ed.; Chapman and Hall: New York, 1996; p. 75-93.
- Puschner B. Mycotoxins. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2002; 32: 409-419.
- Rumbeiha W. Mycotoxins may cause clinical symptoms in pets. *Feedstuffs* 2002; 29: 14-15.
- Food and Agriculture Organization of the United Nation/International Atomic Energy Agency (FAO/IAEA). Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control, in *Food and Nutrition Paper; Food and Nutrition Division*, FAO: Rome, Italy, 2001; Vol. 73, p. 7-13.
- Van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 1965; 205: 1112-1113.
- Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Cabañes FJ. Current importance of ochratoxin A producing *Aspergillus* spp. *J Food Prot* 2001; 64: 903-6.
- Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venâncio A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int J Food Microb* 2003; 88: 63-68.
- Tanchev Y and Dorossiev D. The first clinical description of Balkan endemic nephropathy (1956) and its validity 35 years later. *IARC Sci Publ* 1991; (115): 21-28.
- Kuczuk MH, Benson PM, Health H, Hayes W. Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 1978; 53: 11-20.
- Krogh, P. Ochratoxin A in Food, Academic Press, New York 1987; p. 97-121.
- Lebrun S, Follmann W. Detection of ochratoxin A induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch Toxicol* 2002; 75: 734-741.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon, France: IARC 1993; 56:489-521.
- Gautier J, Richoz J, Welti DH, Markovic J, Germaud E, Guengerich FP and Turesky RJ. Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chem Res Toxicol* 2001; 14: 34-45.
- Schlatter C, Studer-Rohr J, Rasonyi T. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 1996; 13 Suppl: 43-44.
- Pfohl-Leszkiwicz A, Manderville RA. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51: 61-99.
- Hennig A, Fink-Gremmels J, Leistner L. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation, in: Castegnaro, Plestina, Dirheimer, Chernozemsky and Bartsch (Eds.). *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*. IARC Scientific Publications No. 115, 1991, Lyon, France, p. 255 -260.
- Föllmann W, Hillebrand LE, Creppy EE and Bold HM. Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated by OTA and alpha OTA. *Arch Toxicol* 1995; 69: 280-286.
- Lioi MB, Santoro A, Barbieri R, Salzano S and Ursini MV. Ochratoxin A and zearalenone: A comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes. *Mutat Res* 2004; 557: 19-27.
- Manolova Y, Manolov G, Parvanova L, Petkova-Bocharova T. Induction of characteristic chromosomal aberrations, particularly x-trisomy, in cultured human lymphocytes treated by ochratoxin A, a mycotoxin implicated in Balkan endemic nephropathy. *Mutat Res* 1990; 231: 143 -149.
- Manolov G, Manolova Y, Castegnaro M and Chernozemsky IN. 1991 Chromosomal alterations in lymphocytes of patients with Balkan endemic nephropathy and of healthy individuals after incubation in vitro with ochratoxin A, in Castegnaro, Plestina, Dirheimer, Chernozemsky and Bartsch (Eds.). *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, IARC Scientific Publications No. 115, Lyon, France, p. 267 -272.
- Seoane AI, Dulout FN. Use of the anaphase-telephase test to detect aneuploidic compounds: effects of

**J. De Luca y col.**

propionaldehyde and cadmium chloride. Bull Environ Contam Toxicol 1994; 53: 924-929.

24. Knasmüller S, Cavin C, Chakraborty A, Darroudi F, Majer BJ, Huber WW, Ehrlich BA. Structurally related mycotoxins ochratoxin A, ochratoxin B, and citrinin differ in their genotoxic activities and in their mode of action in human-derived liver (HepG2) cells: implications for risk assessment. Nutr Cancer 2004; 50: 190-197.