

## IN VITRO BIOACCESSIBILITY OF OCHRATOXIN A AND ASSESSMENT OF ITS CYTOTOXICITY AND GENOTOXICITY IN HUMAN CELL CULTURE

**Autora:** Cyndia Azucena González Arias.

**Directores:** Dr. Antonio J. Ramos Girona y Dr. Vicente Sanchis Almenar.

**Centro de realización:** Dpto. Tecnología de Alimentos- Universitat de Lleida.

**Centro de defensa:** Universitat de Lleida.

El uso de microorganismos para la bioremediación de metales pesados y radionúclidos presentes en muchos ecosistemas —por causas naturales así como consecuencia de actividades antropogénicas— es especialmente interesante en condiciones de pH neutro. Los minerales de hierro que incrustan estas bacterias (BIOS por sus siglas en inglés), debido a que tienen una estructura poco cristalina y a su gran reactividad y superficie específica, son excelentes materiales para la recuperación de contaminantes inorgánicos.

La ocratoxina A (OTA) es una micotoxina producida por varias especies de mohos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Es bien conocido que la OTA es una de las micotoxinas más ubicuas, ya que se ha encontrado en una gran variedad de alimentos tanto de origen vegetal como animal. El vino es un alimento que se encuentra contaminado con frecuencia con OTA y que puede tener una importante contribución a la exposición humana a esta micotoxina. Estudios en roedores han demostrado que la OTA es capaz de promover el desarrollo de tumores renales y hepáticos. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado a la OTA en el grupo 2B (posible compuesto carcinógeno para el hombre), porque los datos que demuestran la carcinogenicidad de la OTA en humanos aún son insuficientes.

Esta tesis doctoral tuvo dos objetivos generales: i) evaluar la bioaccesibilidad de la OTA en vino tinto, y ii) evaluar la citotoxicidad, genotoxicidad y la modulación de la expresión génica por la OTA.

En el caso de la bioaccesibilidad de la OTA, se llevó a cabo un estudio en vino tinto con tres niveles de contaminación de OTA (1,0-4,0 µg/L) en un sistema *in vitro* de digestión dinámica simulada. Los resultados de este estudio mostraron que la OTA es altamente bioaccesible en jugo gástrico (103-128%), pero poco bioaccesible en el jugo intestinal (<26%). En este sistema se evaluó también la transformación de la OTA a OTα, encontrando que la cantidad de OTα generada en la digestión gástrica varió

entre el 5,1-19,1%, mientras que en el compartimento intestinal no excedió del 5%.

La evaluación de la citotoxicidad de la OTA fue llevada a cabo usando varios ensayos *in vitro*, y tres tipos de cultivos celulares (linfocitos humanos, y las líneas celulares Caco-2 y HepG2). Los ensayos de viabilidad mostraron que bajas dosis de OTA (0,075-45 µM) no causan viabilidades por debajo del 65%. Aplicando estas mismas dosis, tras 24 h de exposición se detectó un daño significativo en la integridad de la membrana celular de las células Caco-2 diferenciadas y un efecto citostático en linfocitos humanos tratados con 15 µM de OTA.

En el caso de las células Caco-2, se estudió el efecto de la exposición a bajas dosis de OTA, sola o de forma conjunta con la micotoxina deoxinivalenol (DON), y se evaluó el presunto efecto protector del antioxidante resveratrol (RES), compuesto naturalmente presente en el vino tinto. La co-exposición a ambas micotoxinas aumentó significativamente la citotoxicidad de ambos compuestos en las células Caco-2, sin aumentar por ello la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). La co-exposición de OTA o DON con RES no disminuyó la citotoxicidad, más bien al contrario, se observó un aumento de la citotoxicidad no asociado con un aumento en la producción de ERO.

Se usaron dosis bajas de OTA, inferiores a 45 µM, para evaluar la expresión de genes del sistema biotransformador de xenobióticos (genes del grupo CYP P450), así como la de los genes COX-2, LOX-5, y MRP2. Para ello se empleó un sistema de co-cultivo de células Caco-2 y HepG2 (placas de cultivo *transwell*) para simular la absorción intestinal y el metabolismo hepático. Los resultados indican que la OTA es capaz de modular fuertemente la expresión de los genes estudiados, teniendo, por lo general, el tiempo de exposición a la OTA un mayor efecto sobre la modulación de los genes y la integridad de la membrana (medida por la resistencia eléctrica transepitelial) que las diferentes dosis de toxina utilizadas en los tratamientos.

En cuanto a la evaluación de la genotoxicidad de la OTA, se ha demostrado que la OTA es una micotoxina genotóxica capaz de inducir formación de micronúcleos en linfocitos humanos, así como de, en un ensayo cometa, incrementar el porcentaje de ADN en los cometas, y causar la acumulación del mismo en las colas de los cometas mediante un retraso en el sistema de reparación del ADN.

Los resultados obtenidos indican que se deben realizar mayores esfuerzos para entender el modo de acción de la OTA, especialmente teniendo en cuenta su posible relación con el desarrollo del cáncer en los seres humanos. Los hallazgos sobre la citotoxicidad y genotoxicidad de la OTA a bajas dosis apoyan la teoría de que la OTA debería de ser considerada un carcinógeno sin umbral.

### Publicación de resúmenes de Tesis Doctorales

**SEM@foro** publica resúmenes de Tesis Doctorales realizadas por miembros de la SEM. Deben enviarse a la Secretaría de la SEM (secretaria.sem@semicrobiologia.org) o al Director Editorial (vicjcid@farm.ucm.es) por correo electrónico, siguiendo el formato: Título, Autor, Director(es), Centro de realización, Centro de presentación (si es distinto) y Resumen (máximo, unas 200 palabras).

**SEM@foro** se reserva el derecho a no publicar la información si el resumen es excesivamente largo o el tema del trabajo no guarda suficiente relación con la Microbiología.