



Universidad Nacional de Córdoba
Dto. De Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas (CIBICI, CONICET)

CARACTERIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DE HONGOS ALTERANTES DE ALIMENTOS UTILIZANDO *Caenorhabditis elegans*

Autor: María Jimena Benito Nacir

Tesis para optar al título de posgrado en:
Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Córdoba, 2019

Universidad Nacional de Córdoba
Dto. De Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas
(CIBICI-CONICET)



CIBICI

C I B I C I

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

Director: Dr. Ramón Asis (rasis@fcq.unc.edu.ar)

Co-director: Dr. Martín Theumer (mgtheumer@fcq.unc.edu.ar)

Miembros del tribunal examinador de tesis:

. MSc. Sofía Cuggino
Magister en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

. Dra. Miriam Virgolini
Doctora en Ciencias químicas
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

. Dra. Carla Barberis (Evaluador externo)
Doctora en Ciencias Biológicas
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Río Cuarto

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico, a mi hijo Fermín que me acompañó desde la panza durante todo el proceso de mi último año de cursado de la Maestría y me permitió culminar con los ensayos de mi tesis, pudiendo así, concluir con las metas planteadas.

A mi compañero Gastón, por el apoyo emocional y económico que me brindó todo el tiempo.

A mi mamá, por enseñarme a ser perseverante, por su incondicionalidad y su presencia en mi vida.

A mis amigos de cursado que me dieron la fuerza para seguir y fueron pilares importantes que no me dejaron caer ante los inconvenientes durante el transcurso de estos dos años compartidos.

A mi amiga Gisela Cipriani por estar siempre y brindarme su ayuda humana y profesional.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, Gastón y Fermín, por acompañarme y apoyarme en este gran desafío profesional.

Al Dr. Ramón Asis, que creyó en mí. Gracias por haberme dirigido en la realización de esta tesis, por enseñarme un mundo nuevo y sostenerme cuando me ganaba la ansiedad.

Al Dr. Martín Theumer por todo lo que me enseñó y ayudó como Co-director de este trabajo. Por ser tan amable y paciente en conmigo.

A mis “compañeras gusaneras”, Andrea Carranza, Yanina Moran y Paula Albrecht por trabajar conmigo, darme su tiempo y ayuda para concretar esta meta. Por compartir charlas, risas, experiencias y darme fuerzas diariamente.

A todo el hermoso grupo humano del laboratorio dirigido por el Dr. Ramón Asis y la Dra. M. Valeria Amé por recibirme y hacerme sentir tan cómoda. A los becarios Andu, Yani, Chani, M. José, Euge, Rocío, Juan y Guido por compartir cada día con tanta alegría, entusiasmo y buena energía.

Al Laboratorio de Bromatología del CIBICI (Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología) y Laboratorio de Micología de alimentos y Micotoxicología por el apoyo económico y por haberme prestado las instalaciones para el desarrollo de este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Uso de <i>C. elegans</i> en ensayos toxicológicos	5
1.1.1 Características del adulto.	5
1.1.2 Ciclo de vida	7
1.1.3 Ventajas del modelo	9
1.1.4 Limitaciones del modelo	10
1.2 Hipótesis	11
1.3 Objetivos	11
1.3.1 General:	11
1.3.2 Específicos:	11
1.4 Materiales y métodos	11
1.4.1 Materiales	11
1.4.1.1 Preparación de extractos fúngicos	12
1.4.1.2 Preparación del medio NGM	12
1.4.1.3 Modelo biológico	13
1.4.1.3.1 Preparación de <i>E. coli</i> OP50, fuente de alimento para los nematodos	13
1.4.1.3.2 Sincronización del <i>C. elegans</i>	13
1.4.2 Métodos	14
1.4.2.1 Tratamientos	14
1.4.2.1.1 Toxicidad aguda	14
1.4.2.1.2 Toxicidad subletal	14
1.4.2.2 Medición de respuestas toxicológicas	15
1.4.2.3 Análisis de los datos	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
2.1 Selección de los extractos de hongos para los ensayos de toxicidad	16
2.2 Identificación de los hongos cuyos extractos mostraron toxicidad	17
2.3 Evaluación del protocolo de exposición de los nematodos a los distintos extractos	20
2.4. Ensayos de Toxicidad aguda	22
2.5 Ensayos de Toxicidad subletal	25
2.5.1 Efecto sobre la evolución de los nematodos	25
2.5.2 Efecto sobre la reproducción de los nematodos	26
2.5.3. Efecto sobre el crecimiento de los nematodos	27
CONCLUSIÓN	29
BIBLIOGRAFÍA	37

RESUMEN

Los alimentos representan una rica fuente de nutrientes para los hongos filamentosos. Dentro de los géneros que contaminan alimentos, hay especies que tienen sobre el alimento funciones beneficiosas en su elaboración y otras que producen alteraciones (cualitativas y cuantitativas) y/o aportan al mismo sustancias tóxicas (micotoxinas).

Existe muy poca información sobre la toxicidad de aquellos hongos alterantes de alimentos que no están incluidos en la categoría de hongos micotoxigénicos. Estos hongos también producen metabolitos secundarios, que aún en bajas concentraciones, podrían representar un riesgo potencial para el consumidor.

En este trabajo se empleó el modelo biológico *Caenorhabditis elegans* con el propósito de evaluar la potencial toxicidad de extractos de hongos filamentosos alterantes de alimentos de comercialización local en la ciudad de Córdoba.

La toxicidad aguda de los extractos se obtuvo con la determinación de la dosis letal 50 (DL50). La toxicidad crónica se estudió considerando el efecto producido sobre la evolución, crecimiento y reproducción del *C. elegans*.

Los resultados muestran que el 50 % de los hongos aislados de alimentos presentaron efectos tóxicos sobre *C. elegans*. Estos hongos pertenecieron a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y a un representante de los Mucorales. Únicamente los extractos de hongos micotoxigénicos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* presentaron efectos de toxicidad aguda y solo algunos de ellos efectos crónicos, ambos efectos podrían estar asociados a sus capacidades de producir micotoxinas. Además, se observaron efectos de toxicidad crónica a nivel del crecimiento y la reproducción de los nematodos por parte del extracto del *Mucoral*. Los hallazgos en trabajos anteriores y estos resultados manifiestan la necesidad de estudios más detallados sobre la toxicidad de los hongos Mucorales.

Palabras claves: hongos filamentosos, alimentos, toxicidad, *C. elegans*, Mucorales.

ABSTRACT

Food represents a rich nutrients source for filamentous fungi. Within the genus that contaminates food, there are species having in food beneficial functions in their preparation and others species producing qualitative and quantitative alterations and / or deposit toxic substances (mycotoxins).

Little is known about the toxicity of those food-altering fungi not included in the mycotoxigenic category. These fungi also produce secondary metabolites, which even at low concentrations could represent a potential risk for consumers.

In this work the biological model *Caenorhabditis elegans* was used with the purpose of evaluating the potential toxicity of extracts from filamentous fungi altering food of local commercialization in the city of Córdoba.

The acute toxicity of fungi extracts was obtained with the determination of lethal dose 50 (LD50). Chronic toxicity was studied considering the effect on the evolution, growth and reproduction of *C. elegans*.

The results show that 50% of the fungi isolated from food presented toxic effects on *C. elegans*. These fungi belonged to the genera of *Aspergillus*, *Penicillium* and a representative of the Mucorales. Only the extracts of mycotoxigenic fungi of the genera *Aspergillus* and *Penicillium* showed acute toxicity effects and only some of them chronic effects, both effects could be associated to their capacity to produce mycotoxins. In addition, chronic toxicity effects were observed at the level of growth and reproduction of the nematodes by the *Mucoral* extract. The findings in previous works and these results show the need for more detailed studies on the toxicity of Mucorales fungi.

Keywords: filamentous fungi, food, toxicity, *C. elegans*, Mucorals.

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO: dimetilsulfóxido

NGM: Nematode Growth Medium

DL50: dosis letal para el 50 % de la población

DL10: dosis letal para el 10 % de la población

DL90: dosis letal para el 90% de la población

LB: Luria-Bertani

L3: estadio larvario L3

L4: estadio larvario L4

Asp: Aspergillus spp.

Pen: Penicillium spp.

Muc: Mucoral

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Micromorfología del adulto de *C. elegans* (Magnificación: 400X).
- **Figura 2.** Anatomía de un adulto hermafrodita (A), y de un macho (B) de *C. elegans*.
- **Figura 3.** Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C.
- **Figura 4.** Características fenotípicas de los estadios larvarios de la cepa silvestre N2.
- **Figura 5.** Sobrevida de nematodos expuestos a una única dosis (10 mg/mL) de extracto de hongos durante 24, 48 y 72 h.
- **Figura 6.** Características de las colonias y micromorfología de los aislamientos fúngicos que presentaron toxicidad letal.
- **Figura 7.** Microestructura del género *Penicillium*.
- **Figura 8.** Microestructura del género *Aspergillus*.
- **Figura 9.** Microestructura de los Mucorales.
- **Figura 10.** Sobrevida de los nematodos a dos sistemas de exposición A) extracto en el medio NGM y B) extracto mezclado con la bacteria a 24, 48 y 72 h.
- **Figura 11.** Nematodos *C. elegans* en estadios L4 y huevos desarrollándose en medio sólido sobre una cepa de bacteria *E.coli*.
- **Figura 12.** Toxicidad letal aguda de los extractos de hongos sobre *C. elegans* a las 24 (A) y 72 horas de exposición (B).
- **Figura 13.** Efecto de los distintos extractos de hongos sobre la eclosión de huevos del *C. elegans*.
- **Figura 14.** Efecto de los extractos de hongos en la evolución de los nematodos a estadio adulto.
- **Figura 15.** Efecto de los extractos sobre la reproducción de los nematodos.
- **Figura 16.** Efecto de los extractos sobre el crecimiento de los nematodos.

3

INTRODUCCIÓN

4

5 Los hongos filamentosos o mohos son organismos eucariotas
6 multicelulares que crecen en forma de una masa enredada conocida como talo
7 o micelio. Éste está compuesto de células alargadas y tubulares, llamadas
8 hifas, envueltas por una pared celular rígida de quitina por lo que no pueden
9 fagocitar partículas alimenticias (Arenas, 2014). Existen miles de especies
10 conocidas de hongos filamentosos, que tienen diversos estilos de vida,
11 incluyendo saprótrofos, mesófilos, psicrófilos y termófilos y muy pocos
12 patógenos oportunistas de los humanos (Pontón y col., 2002). Todos requieren
13 humedad para el crecimiento y se encuentran naturalmente en el suelo, en la
14 superficie de vegetales, en animales, en el aire y algunos viven en ambientes
15 acuáticos. Por ser organismos heterótrofos (quimioorganótrofos) se alimentan
16 de materia orgánica preformada que usan como fuente de energía y de
17 carbono (Arenas, 2014). Este crecimiento sobre material orgánico permite el
18 reciclaje de nutrientes en los ecosistemas. También pueden crecer en
19 alimentos almacenados para animales y humanos, convirtiéndolos en
20 desagradables o tóxicos y, por lo tanto, son una fuente importante de pérdidas
21 de alimentos y enfermedades (Martínez Padrón, 2013).

22 Aquellos de mayor importancia en los alimentos se multiplican por
23 reproducción sexual mediante ascosporas y zigosporas o reproducción asexual
24 por medio de conidios (Winn y col, 2008). Si los hongos sufren períodos de
25 condiciones de muy bajos nutrientes o condiciones que limitan el crecimiento,
26 producen células estabilizadas (caracterizadas por la disminución de la
27 actividad metabólica, la ausencia de extensión celular y el aumento de la
28 resistencia al estrés) para la supervivencia sin crecimiento. Esta estrategia le
29 permite a los hongos superar los períodos adversos y dispersarse en el medio
30 ambiente hasta encontrar condiciones favorables para su desarrollo (Arenas,
31 2014).

32 Se ha descrito un gran número de géneros de hongos filamentosos que
33 contaminan alimentos. Dentro de estos géneros, hay especies que han sido
34 beneficiosos en la elaboración de alimentos o medicamentos. Podemos
35 mencionar distintas especies de *Penicillium* que desarrollan un papel

36 fundamental en la producción, maduración y curación de los quesos (Godínez y
37 col., 2010), aportando sabor y aroma al roquefort y al queso brie. *Aspergillus*
38 spp. se utiliza para fermentar salsa de soja y producir ácido cítrico o ácido
39 glucónico (Leal y col., 2011), y *Saccharomyces cerevisiae* que se emplea en la
40 producción de pan, cerveza y vino (Rendueles y col., 2014).

41 Sin embargo, la mayoría de los hongos que colonizan alimentos
42 producen alteraciones cualitativas, como *P. digitatum* en la fruta (Lado y col.,
43 2011) o *Rhizopus stolonifer* en el pan (Ruiz García y col., 2011), presentan
44 esporas verdeazuladas, blancas o grisáceas en la superficie de los alimentos
45 que llevan a una rápida destrucción del tejido en toda la anatomía del producto.

46 Además de estos efectos alterantes del alimento, algunas especies de
47 hongos han ganado una mayor atención por los organismos de seguridad
48 alimentaria por su capacidad de producir micotoxinas (Alshannaq y Yu, 2017).
49 Estos compuestos son metabolitos secundarios no esenciales para el
50 crecimiento vegetativo, pero con una demostrada bioactividad tóxica. Las
51 micotoxinas tienen estructuras diversas de gran estabilidad y bajo peso
52 molecular que no son modificadas por la cocción ni los procesos de
53 transformación de los alimentos (Muñoz y col., 2015). Se suelen formar al final
54 de la fase exponencial o al principio de la fase estacionaria de crecimiento del
55 moho, siendo a menudo asociados con la diferenciación y esporulación.

56 Las especies toxigénicas más estudiadas pertenecen a los géneros
57 *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*, por su capacidad de sintetizar
58 micotoxinas y crecer en una gran variedad de alimentos (Waśkiewicz y
59 Golinski, 2015). Pueden contaminar los alimentos, piensos, o materias primas
60 utilizadas para su elaboración, originando un grupo de enfermedades y
61 trastornos, denominados micotoxicosis, que resultan tóxicos para el hombre o
62 los animales.

63 Las micotoxinas más importantes por su capacidad toxigénicas son:
64 aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos y las fumonisinas (Serrano Colli y
65 Cardona Castro, 2015). Una determinada especie puede producir diferentes
66 micotoxinas (Chulze, 2013).

67 En términos generales, el riesgo de intoxicación aguda por micotoxinas
68 en el hombre es bajo o moderado en comparación con intoxicaciones de origen
69 microbiológico o por contaminantes químicos. No obstante, pueden causar dos

70 tipos básicos de toxicidad, aguda y crónica. El efecto agudo más descrito
71 involucra el deterioro de la función hepática y renal que en casos extremos
72 puede producir la muerte. Algunas interfieren en la síntesis de proteínas y otras
73 son neurotóxicas, que en dosis altas son letales. Los efectos crónicos también
74 son variados, van desde la inducción de cáncer hasta efectos mutagénicos y
75 teratogénicos si afectan la replicación del ADN (Basílico, 2001). Estudios
76 actuales demostraron que los efectos crónicos a bajas dosis son los de mayor
77 riesgo de exposición en las poblaciones modernas (Alshannaq y Yu, 2017;
78 Santillán Mendoza y col., 2017; Waśkiewicz y Golinski, 2015).

79 Notoriamente, a pesar del gran número de géneros fúngicos que
80 contaminan alimentos y de su gran capacidad de sintetizar metabolitos
81 secundarios, existe poca información de la toxicidad de una porción mayoritaria
82 de hongos alterantes de alimentos que no clasifican en la categoría de los
83 hongos micotoxigénicos mencionados. Teniendo en cuenta además, que los
84 hábitos de los consumidores pueden favorecer el ingreso de estos
85 contaminantes al organismo, resulta necesario estudiar su toxicidad. Por
86 ejemplo, la eliminación de regiones contaminadas por hongos alterantes en un
87 alimento por la simple escisión de esa región, una práctica habitual previa al
88 consumo de las frutas, no elimina los metabolitos fúngicos difundidos a los
89 tejidos no afectados, y pone en evidencia una fuente de exposición. Aún
90 cuando se encuentren en bajas concentraciones, algunas de estas sustancias
91 pueden representar un riesgo potencial para la salud de la población,
92 principalmente de aquellos países que no controlan estos contaminantes
93 (Trigos y col., 2008; Ferratto y col., 2012).

94 La evaluación de la toxicidad de un compuesto o mezcla de sustancias
95 comprende una gran variedad de ensayos y se realizan con la expectativa de
96 que la información adquirida en un modelo particular se aplicará en otros
97 sistemas biológicos, y con la particularidad de que cada modelo presenta
98 fortalezas y debilidades (Hunt, 2016).

99 La investigación con animales de experimentación representa el “Gold
100 standard” actual en la toxicología (Hunt, 2016). Su utilización en el campo
101 científico se centra en la existencia de semejanzas significativas entre los
102 sistemas fisiológicos de los seres humanos y los de varias especies animales
103 (Cardozo y Mrad, 2008). Se usan modelos de mamíferos para probar toxicidad

104 a los xenobióticos los cuales presentan, como se mencionó, una analogía
105 fisiológica con la especie humana (Romero Fernández y col., 2016). Sin
106 embargo estos modelos son generalmente costosos, requieren mucho tiempo
107 (Nass y Hamza, 2007; Tralau y col., 2012) y además pueden mostrar bajos
108 valores predictivos (Hartung, 2009; Olson y col., 2000). Para incrementar el
109 valor predictivo se recomienda el uso de más de una especie de mamífero que
110 conlleva a un mayor costo de producción, mantenimiento, laboriosidad (Olson y
111 col., 2000) y la necesidad de personal capacitado para su manejo. Por estas
112 razones, la toxicidad predictiva busca utilizar métodos alternativos para mejorar
113 la predicción de los resultados en humanos, reducir los costos y el uso de
114 animales de experimentación.

115 Otro aspecto a considerar es el bienestar de los animales usados para la
116 investigación, el cual tomó interés en los últimos años por sus implicancias
117 éticas. En general se debe procurar disminuir su dolor y estrés, conocer la
118 especie con la cual se trabaja, monitorearla rutinariamente e inculcar el respeto
119 hacia los animales por quienes los manipulan (Suárez Esquivel y Estrada
120 König, 2011), prestando especial atención al diseño experimental y la selección
121 del modelo animal para refinar los protocolos de trabajo. Según la
122 Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE), el uso de
123 animales en la investigación es vital. En la actualidad, la investigación
124 científica se rige por el principio de las tres erres: **Reemplazo** del uso de
125 animales por técnicas que no los necesiten siempre que sea posible,
126 **Reducción** al mínimo el número de animales utilizados y **Refinamiento**,
127 asegurándose que los animales sufren lo menos posible.

128 Por las razones expuestas cada vez es más frecuente el uso de
129 alternativas a la experimentación animal como el uso de procariontes, protistas,
130 hongos, invertebrados, vertebrados inferiores (“pez cebra” conocido como
131 *Danio rerio*) y cultivos celulares. Finalmente, el uso de Bioinformática ha
132 revolucionado la experimentación animal, no solo por sus resultados, sino
133 también por la alta velocidad de procesamiento y los costos (Romero
134 Fernández y col., 2016).

135 Cabe destacar que por ahora, los modelos animales se siguen
136 utilizando para predecir niveles seguros de exposición humana porque ninguna
137 combinación de ensayos alternativos actuales puede representar la

138 complejidad del metabolismo que interactúa, la homeostasis y los mecanismos
139 de señalización que están presentes en los mamíferos (Tice y col., 2013).

140 En comparación con las pruebas en animales de experimentación, el uso
141 de células humanas primarias tiene el potencial de reflejar con mayor exactitud
142 el metabolismo y los modos de acción específicos de los xenobióticos en los
143 seres humanos (Li y col., 1999; Miranda y col., 2009; Scott y col., 2013). Los
144 protocolos para cultivos de células estables como para los cultivos primarios,
145 están bien estandarizados y descritos en la literatura científica. Sin embargo, su
146 utilidad está condicionada por la gran cantidad de animales sacrificados para
147 obtener suplementos para el crecimiento celular (Romero Fernández y col.,
148 2016) y por el hecho de que estos resultados no predicen una respuesta
149 organizacional. Adicionalmente las pruebas con líneas celulares inmortalizadas
150 pueden tener altas tasas de falsos positivos o falsos negativos (Knight y col.,
151 2009) dependiendo del ensayo tipo.

152 Otra opción es utilizar organismos invertebrados como el nematodo
153 *Caenorhabditis elegans*. A diferencia de las pruebas que emplean un solo tipo
154 celular, los ensayos de toxicidad con *C. elegans* proporcionan datos de un
155 animal entero con propiedades digestivas, reproductivas, endócrinas,
156 sensoriales y neuromusculares intactas y metabólicamente activas (Hunt,
157 2016). En los últimos años se ha demostrado que presentan criterios de
158 valoración sensibles para test de toxicidad (Dhawan y col., 1999; Anderson y
159 col., 2004; Höss y col., 2013).

160 **1.1 Uso de *C. elegans* en ensayos toxicológicos:**

161 **1.1.1 Características del adulto**

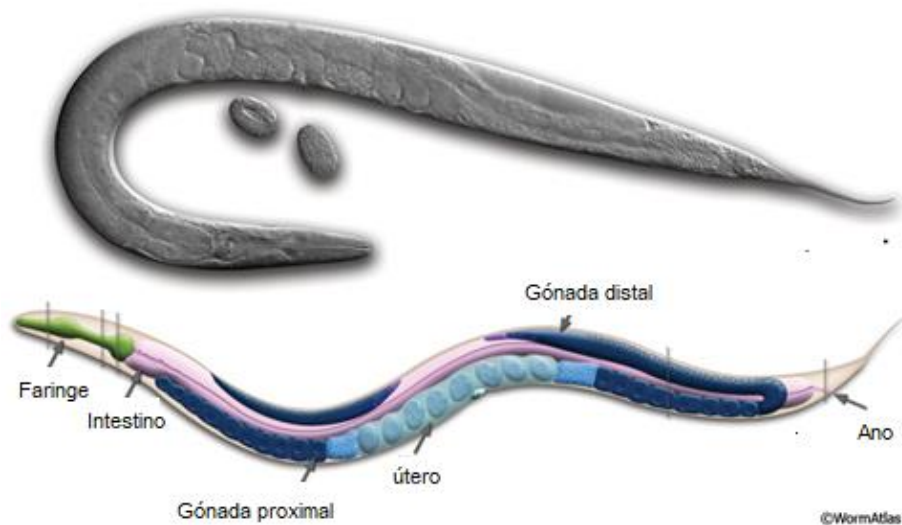
162 El cuerpo de un adulto de *C. elegans* mide aproximadamente 1 mm de
163 longitud (Figura 1). Su transparencia permite la visualización al microscopio del
164 nematodo vivo y de todos los tipos de células en sus distintas etapas de
165 desarrollo. Posee un sistema nervioso sencillo de 302 neuronas en el adulto
166 (Dimitriadi y Hart, 2010; Giles y Rankin, 2009).
167



168
169 **Figura 1.** Micromorfología del adulto de *C. elegans* (Magnificación: 400X).
170

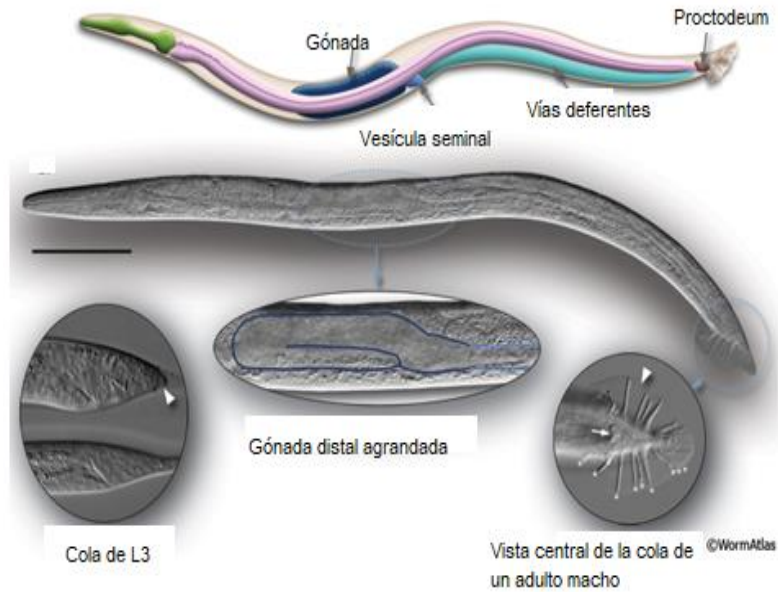
171 Se trata de un organismo androdioco: existen hermafroditas y machos.
172 La mayoría de los individuos son hermafroditas, con dos ovarios, oviductos,
173 una cavidad para almacenar el esperma, llamada espermateca y un útero
174 (L'Hernault, 2009). Los hermafroditas producen ovocitos y espermatozoides, se
175 reproducen por autofecundación. Sin embargo, en caso de existir la posibilidad,
176 copulan con los machos para utilizar su esperma y generar así mayor
177 diversidad genética en la progenie. Los machos, aparecen con una frecuencia
178 inferior al 0.3 % y pueden fertilizar hermafroditas. En la Figura 2 se pueden
179 apreciar las estructuras de ambos sexos.

180 A



181

B



182
183
184
185

Figura 2. Anatomía de un adulto hermafrodita (A), y de un macho (B) de *C. elegans*.
(Adaptado de Worm Atlas)

186 1.1.2 Ciclo de vida

187
188

El ciclo reproductivo de este organismo es corto, de 2 a 3 días a temperatura ambiente, y la vida del adulto en el laboratorio, a temperatura constante de 20 °C, oscila entre 2 a 3 semanas (Giles y Rankin, 2009).

191
192
193
194

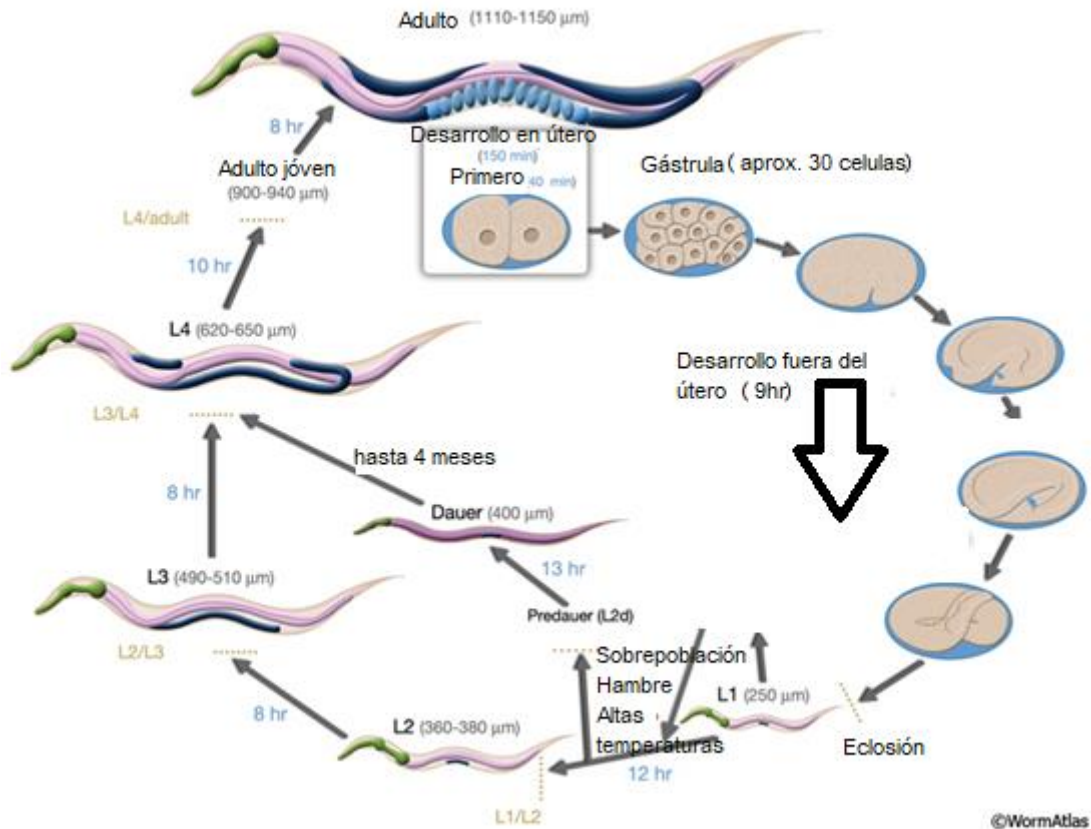
Durante este período el gusano pasa por cuatro fases larvarias, hasta transformarse en un organismo adulto. Cada adulto hermafrodita coloca entre 200 - 300 huevos. El ciclo de vida es dependiente de la temperatura de incubación (García Sancho, 2012).

195
196
197
198
199
200
201

Frente a condiciones adversas, por ejemplo, escasez de alimentos, altas temperaturas o grandes densidades de población, es poco probable una reproducción exitosa, y en tal caso, *C. elegans* puede detener su desarrollo en una etapa alterna llamada *fase dauer*, que se caracteriza por la ausencia del proceso de alimentación, y un aumento de la resistencia de la cutícula. Los gusanos pueden volver a entrar al ciclo de vida reproductiva una vez que las condiciones sean más favorables (Wang y col., 2010).

202
203

En la Figura 3 se representan las distintas fases embrionarias y larvarias por las que pasa un gusano hasta llegar a adulto.



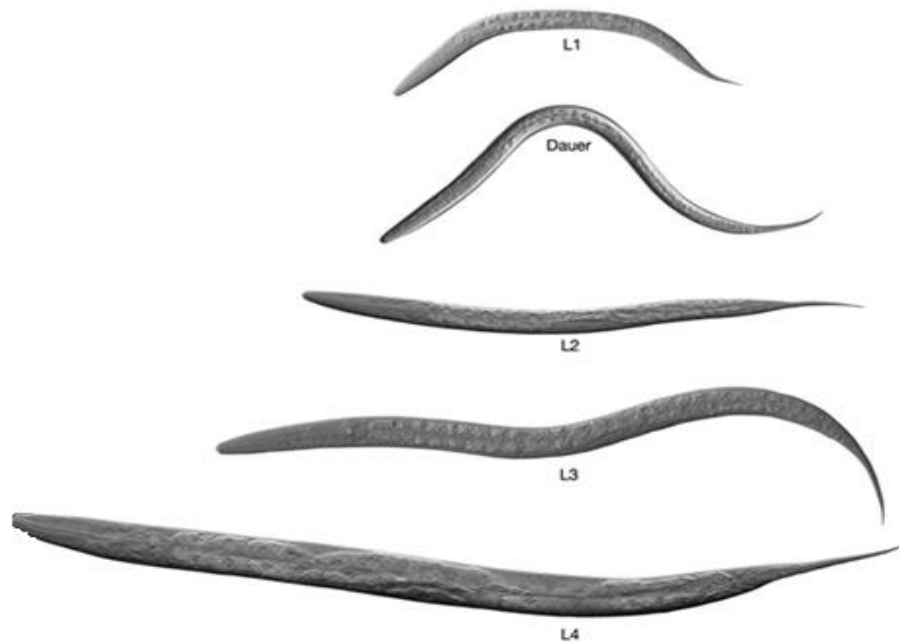
©WormAtlas

204
205
206

Figura 3. Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C (Adaptado de Worm Atlas).

207 Los números azules sobre las flechas indican el tiempo que el nematodo
208 está en determinado estadio antes de mudar al siguiente. La primera división
209 celular ocurre aproximadamente 40 minutos después de la fecundación. La
210 puesta del huevo se da unos 150 minutos después de la fertilización, durante la
211 fase de gástrula cuando cuenta con 30 células.

212 Los distintos estadios del nematodo se pueden apreciar en la siguiente
213 figura:



©WormAtlas

214

215

216 **Figura 4.** Características fenotípicas de los estadios larvarios de la cepa silvestre N2

217

218

(Adaptado de Worm Atlas).

219

1.1.3 Ventajas del modelo

220

221

222

223

224

225

226

227

228

229

230

231

232

233

C. elegans es un nemátodo de vida libre que por sus excelentes características ha sido un importante modelo de estudio para la biología. Propuesto como organismo modelo por Sydney Brenner en 1965 (García Sancho, 2012). Desde entonces, se ha usado en biología celular, neurobiología y genética, empleándose como sistema de excelencia para el estudio de eucariotas superiores (Dimitriadi y Hart, 2010).

Para los estudios toxicológicos se utilizan desde sus células individuales hasta el organismo entero (Zhuang y col., 2014) y por sus características bioquímicas/biológicas es considerado un modelo adecuado para una gran cantidad de estudios. Su corto tiempo de generación (3 días) sumado a su capacidad de autofecundarse, hacen económico su mantenimiento (Zhuang y col., 2014). Es cultivado en el laboratorio utilizando técnicas relativamente sencillas (Roh, 2008; Meyer y col., 2010). Las cepas son mantenidas en incubadora a 20 °C y alimentadas con la bacteria *Escherichia coli* OP50

234 (Williams y Dusenbery, 1990). Como fue mencionado produce una gran
235 progenie, entre 200 y 300 crías (Megalou y Tavernarakis, 2009).

236 Los tejidos transparentes y los planos corporales-neuronales
237 completamente mapeados facilitan la evaluación de su morfología y de la
238 expresión transgénica a nivel tisular, celular y subcelular.

239 Su genoma fue completamente secuenciado, se conoce el linaje celular
240 completo (García Sancho, 2012) y además conserva muchas vías celulares
241 claves de metabolismo y señalización, hecho que favorece la manipulación de
242 sus genes.

243 Sus características alimentarias conservadas lo hacen un buen modelo
244 de toxicidad oral. Se ha demostrado una buena correlación de los puntos
245 finales en *C. elegans* con DL50 de rata (Roh, 2008).

246 Otro factor a tener en cuenta es su esperanza de vida de 2 a 3 semanas.
247 Por todo lo anterior, se trata de una plataforma económica y compacta que
248 permite realizar pruebas de generación múltiple en un par de semanas y
249 evaluar múltiples concentraciones y tiempos de exposición simultáneamente.

250 **1.1.4 Limitaciones del modelo**

251 *C. elegans* carece de muchos órganos de mamíferos como ojos,
252 pulmones, corazón, riñones e hígado. Tiene un sistema inmune innato que
253 funciona, pero carece de inmunidad adaptativa. No es un buen modelo de
254 absorción debido a su dura cutícula. Pequeños cambios en la temperatura, los
255 nutrientes o la concentración de sal provocan respuestas adaptativas que
256 pueden alterar significativamente los resultados de los análisis, a veces para
257 varias generaciones, hecho que actualmente limita el número de compuestos
258 que pueden analizarse en un solo ensayo.

259 El manejo incorrecto de los cultivos de reserva puede dar como
260 resultado patrones de expresión genética alterados y la acumulación de dauers
261 o machos. Es necesario el entrenamiento previo para el reconocimiento de
262 fenotipo y buenas prácticas de cultivo de *C. elegans*, en especial para obtener
263 datos confiables y reproducibles.

264 Algunos sistemas de *C. elegans* responden de manera similar a los
265 sistemas de mamíferos análogos, pero carecen de homología a nivel genético
266 (por ejemplo, el sistema inmune innato), esto llevó al desarrollo de software de

267 análisis de microarreglos específico para *C. elegans* utilizando datos
268 disponibles para solucionar este problema (Roh, 2008).

269 Teniendo en cuenta este contexto, en el presente trabajo se empleó al
270 organismo *C. elegans* como modelo predictivo para evaluar la potencial
271 toxicidad de extractos de hongos filamentosos alterantes de alimentos, aislados
272 de alimentos comercializados en la ciudad de Córdoba.

273 **1.2 Hipótesis**

274 Las especies fúngicas no micotoxigénicas que alteran alimentos
275 producen metabolitos que los contaminan e inducen efectos tóxicos en
276 invertebrados, evidenciando su potencial toxicidad cuando son ingeridos por los
277 humanos.

278 **1.3 Objetivos**

279 **1.3.1 General:**

- 280 - Evaluar la toxicidad de extractos de hongos alterantes de alimentos en
281 un modelo experimental con *C. elegans*.

282 **1.3.2 Específicos:**

- 283 - Evaluar en *C. elegans* la toxicidad aguda de extractos de hongos
284 desarrollados en los alimentos de comercialización local.
- 285 - Evaluar en *C. elegans* la toxicidad crónica de los extractos que hayan
286 mostrado mayores efectos agudos.

287 **1.4 Materiales y métodos**

288 **1.4.1 Materiales**

- 289 - Fuente de aislamiento de hongos: En este trabajo se utilizaron alimentos
290 comercializados en la ciudad de Córdoba (aceitunas negras y verdes,
291 papaya, mandarina, tomate, pimiento, maíz, salame, pan, pan
292 multicereal, chipá y pan criollo) contaminados con hongos alterantes.
- 293 - Organismos: cepa N2 de *C. elegans* var. Bristol, *Escherichia coli* (*E.coli*)
294 OP50.
- 295 - Medios de cultivo: agar Sabouraud y medio NGM (nematode growth
296 medium).

297 - Solventes y reactivos empleados: etanol al 99,5 %, DMSO, CaCl₂ 1M,
298 colesterol, MgSO₄ 1M, buffer de fosfatos de concentración 1M (pH 6) y el
299 antibiótico estreptomicina.

300 **1.4.1.1 Preparación de extractos fúngicos**

301 Para preparar los extractos fúngicos se aislaron hongos de diferentes
302 alimentos locales visiblemente contaminados o infectados por mohos
303 ambientales, en placas de Petri de agar Sabouraud. Una vez desarrollados los
304 micelios (7 días, aproximadamente), se examinaron al microscopio a los fines
305 de seleccionar 15 aislamientos para su purificación.

306 Con el objeto de purificar los mohos seleccionados en el punto anterior
307 se realizaron cultivos monospóricos en medios sólidos. Los aislamientos
308 purificados se sembraron sobre papel de filtro estéril adherido en placas de
309 agar Sabouraud (5 placas por hongo), a los fines de poder contar con suficiente
310 biomasa fúngica para preparar los extractos cuyas actividades fueron
311 estudiadas. Los hongos se cultivaron por 7 días a temperatura ambiente y
312 posteriormente el micelio desarrollado sobre el papel de filtro fue separado del
313 medio para preparar los extractos.

314 Los extractos etanólicos se obtuvieron, sonicando durante 10 minutos
315 los filtros de papel con micelio en un tubo con 50 mL de etanol absoluto. Los
316 tubos fueron centrifugados y el sobrenadante fue colectado en un nuevo tubo.
317 La operación se repitió para recuperar la mayor cantidad de material posible.
318 Los extractos etanólicos se centrifugaron (10 min, 1000 g) y los sobrenadantes
319 fueron filtrados a través de membranas de poro de 45 µm. Los extractos fueron
320 secados en un evaporador rotatorio a temperatura ambiente y posteriormente
321 pesados. Los extractos secos resultantes fueron resuspendidos en DMSO
322 hasta una concentración final de 200 mg/mL. Finalmente se filtraron para
323 esterilizarlos (0,22 µm) y se conservaron a - 80 °C hasta su utilización.

324 **1.4.1.2 Preparación del medio NGM**

325 Para preparar el medio NGM se utilizó NaCl, agar y peptona disueltos en
326 agua Milli-Q (ultrapura). Se esterilizó en autoclave y posteriormente fue
327 enriquecido con CaCl₂ 1M, colesterol disuelto en etanol, MgSO₄ 1M y buffer de
328 fosfatos 1M. Además se adicionó estreptomicina (20 mg/mL) para frenar el
329 desarrollo bacteriano.

330 **1.4.1.3 Modelo biológico**

331 Se utilizó para este estudio la cepa N2 de *C. elegans* var. Bristol,
332 cultivada en cajas de Petri con medio NGM previamente sembradas con la
333 cepa de *Escherichia coli* OP50 a 20 °C (Stiernagle, 2006; Roh y col., 2008).

334 **1.4.1.3.1 Preparación de *E. coli* OP50, fuente de alimento para los**
335 **nematodos**

336 A partir de un stock de bacteria *E. coli* OP50 conservado a - 80 °C, se
337 sembraron 100 µL en caldo LB, y se incubó a 37 °C agitándolo durante toda la
338 noche para favorecer el crecimiento del inóculo. A partir de este cultivo se
339 sembraron las placas NGM e incubaron durante una noche a 37 °C para formar
340 un césped de bacteria donde los nematodos se alimentaron y desarrollaron
341 hasta alcanza el estadio necesario para los estudios de toxicidad.

342 Para realizar los ensayos de toxicidad, las placas NGM fueron
343 sembradas con bacteria muerta para evitar la degradación de los compuestos
344 en los extractos por la bacteria.

345 Un volumen de bacteria viva en caldo LB fue centrifugado a una
346 velocidad entre 1789 - 2795 g por 10 minutos, eliminándose el sobrenadante y
347 resuspendiéndose en un volumen que produzca una suspensión con una
348 densidad óptica de 1.7. Posteriormente se lo expuso a Shock térmico en un
349 baño de incubación a 65 °C durante 30 minutos con el propósito de causar la
350 muerte de la *E. coli*.

351 Como se describió, se colocaron 100 µL de bacteria por placa de Petri
352 de NGM previamente atemperadas a 20 °C y se las llevó a estufa de 37 °C
353 hasta absorción total de la bacteria.

354 **1.4.1.3.2 Sincronización del *C. elegans***

355 El método de sincronización es necesario para trabajar con el nematodo
356 siguiendo el orden de su ciclo de vida. Este procedimiento permite eliminar las
357 larvas y quedarse con los huevos, con el fin de empezar los ensayos estando
358 los nematodos en el mismo estadio larvario.

359 Para este procedimiento, los gusanos adultos jóvenes fueron
360 transferidos a placas de NGM con bacterias vivas e incubadas a 20 °C hasta
361 obtener una buena cantidad de huevos. Las placas con mayor cantidad de

362 huevos se lavaron con agua destilada estéril y se colectó el líquido de lavado
363 en un tubo falcon de 15 mL, estéril. Esta operación se realizó hasta recoger un
364 volumen final de lavado de 5 mL. Se agregó 500 µL de NaOH 5M y 8 µL de
365 lavandina pura (Cloro: 55 g/L) y se mezcló en vórtex durante 30 segundos cada
366 2 minutos en un lapso de 10 minutos.

367 Posteriormente, se centrifugó a bajas revoluciones (700 g) durante 30
368 segundos, descartándose el sobrenadante hasta aproximadamente 100 µL. El
369 sedimento fue lavado una vez agregando 5 mL de agua destilada, agitándose
370 en el vórtex, y centrifugándose a 700 g durante 30 segundos. Finalmente se
371 descartó el sobrenadante dejando aproximadamente 200 µL, en el cual se
372 homogeneizó el sedimento y posteriormente se sembró en placa con NGM con
373 *Escherichia coli* OP50 viva, incubándose a 20 °C durante tres días chequeando
374 diariamente el contenido de alimento (Porta de la Riva y col., 2012).

375

376 **1.4.2 Métodos**

377 **1.4.2.1 Tratamientos**

378 **1.4.2.1.1 Toxicidad aguda**

379 Para el ensayo de **toxicidad aguda**, se utilizó la cepa N2 de *C. elegans*
380 var. Bristol en estadio larvario L4 colectados del cultivo sincronizado. Los
381 gusanos se incubaron en medios NGM con las distintas concentraciones de los
382 extractos de hongos puros durante 24, 48 y 72 h. Se calculó la DL50 (dosis que
383 causa la muerte del 50 % de la población expuesta) con el propósito de
384 detectar el extracto de mayor toxicidad. Además a partir de este ensayo se
385 puede determinar la DL10 y DL90.

386 **1.4.2.1.2 Toxicidad subletal**

387 La **toxicidad subletal** se evaluó considerando el efecto de los extractos
388 fúngicos sobre la evolución, el crecimiento y la reproducción, exponiendo los
389 gusanos a concentración subletal de 10 mg/mL de los extractos.

390 Para el **efecto sobre la evolución**, los huevos de *C. elegans* fueron
391 expuestos al extracto durante 96 h y posteriormente se cuantificó el número de
392 huevos que eclosionaron y el número de gusanos que llegaron a adultos.

393 Para estudiar el **efecto sobre el crecimiento**, los gusanos pre-adultos
394 (L3) fueron expuestos 24 h al extracto y se cuantificó la longitud corporal por

395 microscopía, previo shock térmico a 50 °C durante 10 minutos y posterior
396 coloración con Rosa de Bengala.

397 Para evaluar el **efecto sobre la reproducción**, los gusanos pre-adultos
398 (L3) fueron expuestos individualmente al extracto durante 24 h y posterior
399 cuantificación de postura de huevos.

400 Todos los ensayos se realizaron por duplicado y fueron referidos al
401 control expuesto a DMSO (vehículo).

402

403 **1.4.2.2 Medición de respuestas toxicológicas**

404

405 **Mortalidad y sobrevida:** se realizó el recuento de gusanos vivos y muertos. Se
406 determinaron los porcentajes de mortalidad y sobrevida de la siguiente manera:

407

$$408 \quad \text{Mortalidad (\%)} = \text{Muertos} / (\text{Vivos} + \text{Muertos}) \times 100$$

409

$$410 \quad \text{Sobrevida (\%)} = 100 - (\text{Muertos} / (\text{Vivos} + \text{Muertos}) \times 100$$

411 **Evolución:** número de huevos que eclosionan y número de gusanos que
412 llegaron a adultos.

413 **Crecimiento:** variación de la longitud corporal de la población expuesta.

414 **Reproducción:** recuento promedio de producción de huevos por adulto.

415

416 **1.4.2.3 Análisis de los datos**

417

418 Se utilizó el software estadístico INFOSTAT versión 2017p (Universidad
419 Nacional de Córdoba). Para las respuestas toxicológicas estudiadas, se realizó
420 un análisis de la varianza (ANAVA). En aquellas donde se observaron
421 diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) se utilizó un test *a*
422 *posteriori* de comparaciones múltiples de LSD Fisher.

423

424

425

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

426

427 **2.1 Selección de los extractos de hongos para los ensayos de toxicidad**

428 Previo a los ensayos de toxicidad aguda y crónica, se evaluó la toxicidad
429 letal de 15 extractos (a una concentración de 10 mg/mL) correspondientes a
430 aislamientos de hongos de diferentes fuentes alimentarias. De este estudio se
431 detectaron 7 extractos con capacidad de producir mortalidad en la población de
432 *C. elegans* (L4) superior al control en un periodo de 72 h. Todos los ensayos se
433 realizaron por duplicado y referidos al control donde los gusanos fueron
434 expuestos a DMSO.

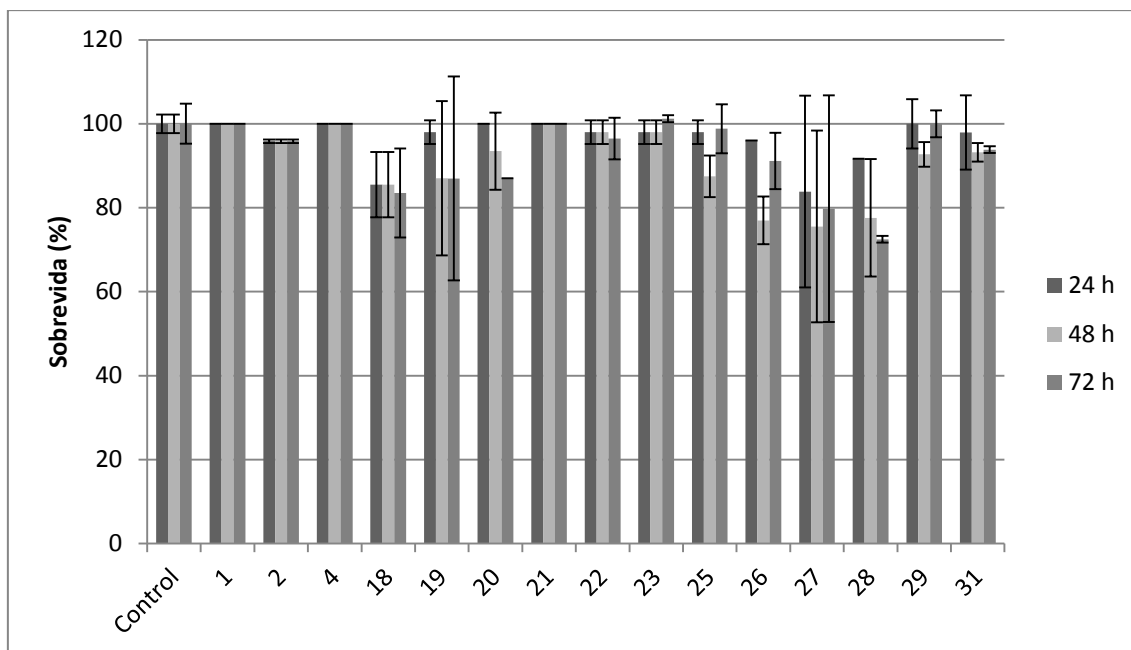
435 El porcentaje de sobrevivencia de los nematodos incubados con los distintos
436 tratamientos puede apreciarse en la Figura 6. Los extractos de hongos 18, 19,
437 20, 25, 26, 27 y 28 mostraron una tendencia de toxicidad a las 72 h de
438 exposición y a pesar de que el análisis estadístico no arrojó diferencias
439 significativas entre los distintos tratamientos ($p > 0,05$), estos resultados
440 sugirieron efectos tóxicos subletales en *C. elegans*, por lo que fueron
441 seleccionados para profundizar los estudios de toxicidad aguda y crónica.

442 El efecto tóxico fue mayor en el caso de los extractos 18,19, 20 y 28.
443 Mientras los demás no presentaron diferencias frente a lo observado en las
444 exposiciones a 24 y 48 h.

445

446

447



448
449
450
451

Figura 5. Sobrevida de nematodos expuestos a una única dosis (10 mg/mL) de extracto de hongos durante 24, 48 y 72 h.

452 **2. 2 Identificación de los hongos cuyos extractos mostraron toxicidad**

453 Para la identificación de los hongos a partir de los cuales se prepararon
454 los extractos, se realizó un examen microscópico de las colonias, donde se
455 observaron las estructuras de fructificación.

456 Fueron identificados un total de tres géneros, entre los que se
457 encontraron: *Aspergillus* spp. (43 %), *Penicillium* spp. (43 %) y Mucorales
458 (14 %). Los aislamientos 18, 19 y 28 pertenecían al género *Penicillium*, los
459 aislamientos 20, 25 y 27 pertenecían al género *Aspergillus*, y el aislamiento 26
460 correspondía al orden de los Mucorales.

461 En la Figura 6 se muestran las características culturales y la
462 micromorfología de los aislamientos que presentaron toxicidad subletal en
463 *C. elegans*.

464 Las colonias de *Penicillium* (aislamientos 18, 19 y 28) fueron de rápido
465 crecimiento y presentaban un micelio aterciopelado con diferentes tonalidades
466 de verde y textura algodonosa.

467
468
469

470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496

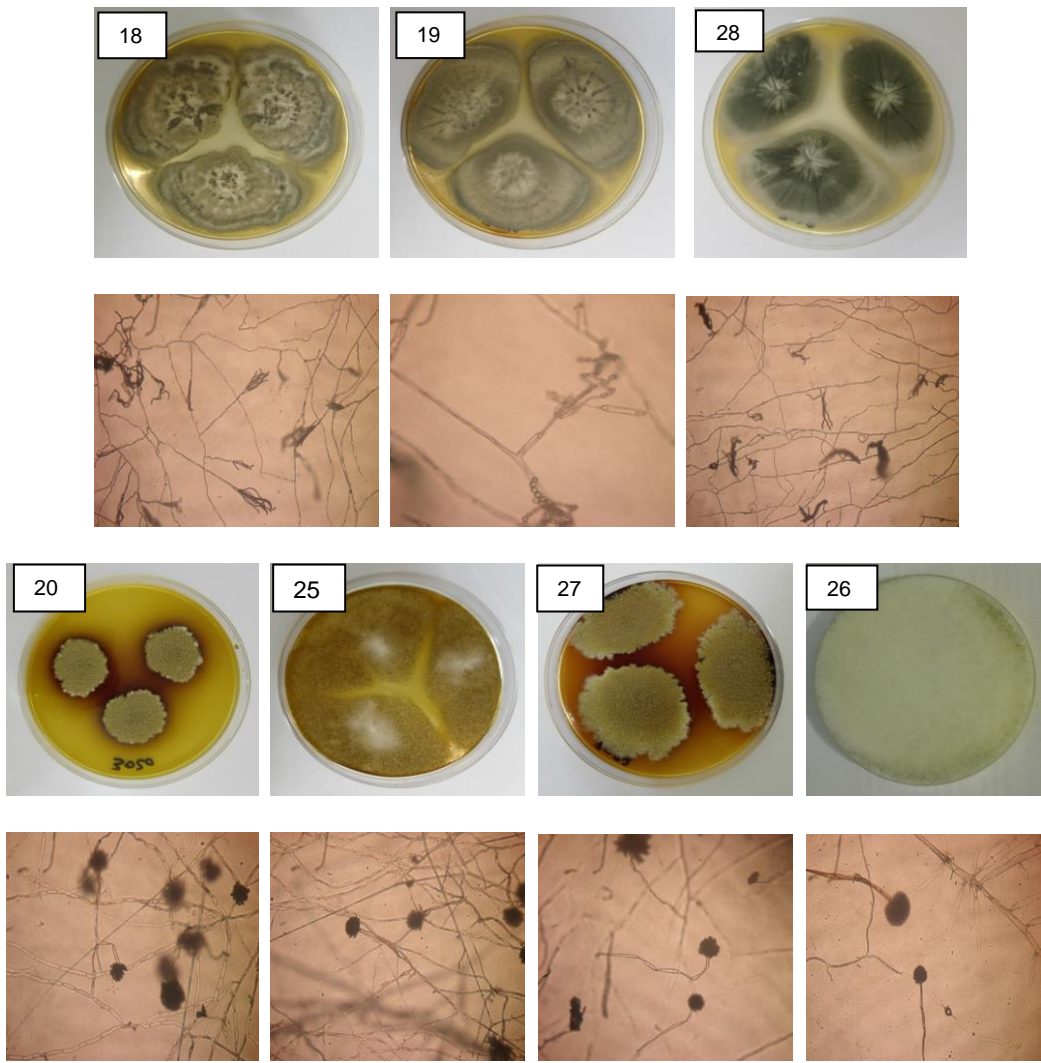
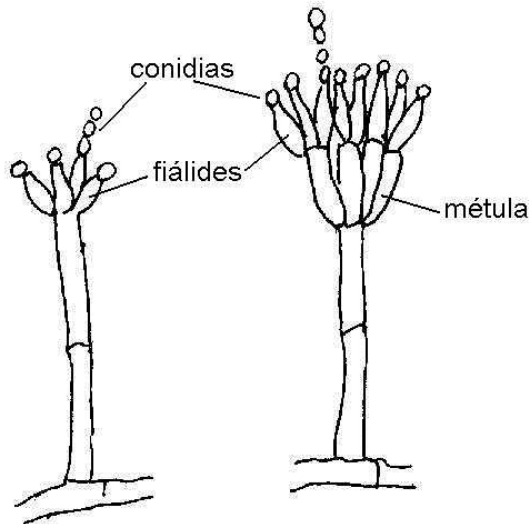


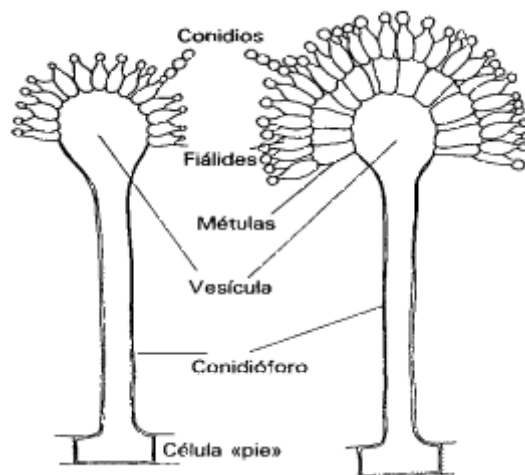
Figura 6. Características de las colonias y micromorfología de los aislamientos fúngicos que presentaron toxicidad letal.

La observación microscópica de sus colonias reveló la presencia de hifas septadas hialinas con conidióforos, métulas, fiálides y conidias globosas. En la Figura 7 se observa la disposición de los elementos mencionados, en una estructura de fructificación de *Penicillium*.



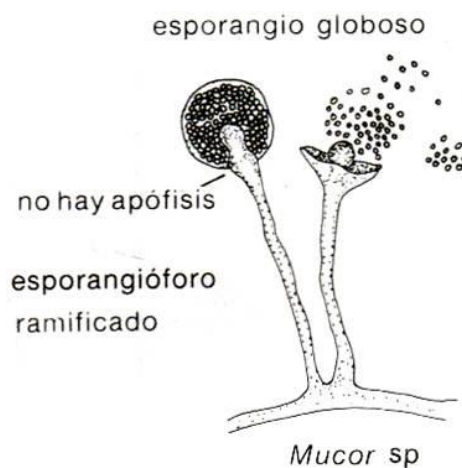
497
498 **Figura 7.** Microestructura del género *Penicillium*.
499

500 Las colonias del género *Aspergillus* (aislamientos 20, 25 y 27) fueron
501 de crecimiento rápido, de color verde/café con halo blanco, planas y con
502 superficie aterciopelada, granulosa o pulverulenta. Sus estructuras
503 microscópicas se caracterizaron por la presencia de la “cabeza aspergilar”
504 constituida por el conidióforo, filamento largo y hialino que termina en una
505 vesícula en la que se disponen hileras de fiálides en forma de botella. En la
506 Figura 8 se muestra la disposición de estos elementos en las estructuras de
507 fructificación del género *Aspergillus*.



509
510 **Figura 8.** Microestructura del género *Aspergillus*.

511 La colonia del Mucoral (aislamiento 26) presentó aspecto algodonoso, de
512 color blanco-amarillento y de rápido crecimiento. El color se volvió más oscuro
513 conforme fue pasando el tiempo, lo que se correlacionó con el desarrollo de los
514 esporangios. El examen micromorfológico reveló la presencia de hifas anchas,
515 irregulares, de forma acintada, no tabicadas (aceptadas) y con una estructura
516 en forma de bolsa que contenía los esporangios (esporas). La disposición de
517 dichas estructuras se puede observar en la Figura 9.
518



519
520
521

Figura 9. Microestructura de los Mucorales.

522 **2.3 Evaluación del protocolo de exposición de los nematodos a los** 523 **distintos extractos**

524 Debido a que en el estudio de toxicidad realizado para la selección de
525 los extractos se observaron signos de toxicidad estadísticamente no
526 significativos, se propuso evaluar el sistema de administración de los extractos
527 a los gusanos. La exposición de *C. elegans* fue evaluada en dos sistemas: 1)
528 administrando los extractos al medio de cultivo NGM (como fue realizado
529 previamente en la selección de extractos), o 2) administrando los extractos
530 junto con las bacterias muertas. Para el primer sistema se prepararon placas
531 de 3 mL de NGM con 30 μ L de extracto de hongo, sobre la superficie se
532 sembró 100 μ L de la suspensión de bacterias muerta, y una vez absorbida se
533 colocaron los nematodos. Para el segundo sistema, los extractos fueron
534 mezclados con la suspensión de bacterias muertas, en lugar de agregarlos al
535 medio de cultivo, y procesados como el sistema 1.

536 Los sistemas de exposición fueron evaluados con dos de los extractos
537 que indujeron toxicidad subletal en el ensayo de selección. Los ensayos se
538 realizaron por duplicado y referidos al control, donde los gusanos fueron
539 expuestos al DMSO incorporado al agar (A) o mezclado con las bacterias (B).

540 Los resultados se registraron a las 24, 48 y 72 h de exposición y se
541 muestran en la Figura 10. Se observaron diferencias en la sobrevivencia de los
542 nematodos expuestos a los dos extractos probados en ambos sistemas de
543 exposición. Los mayores efectos tóxicos se registraron cuando los extractos de
544 hongos se mezclaron con las bacterias y fueron depositados sobre la superficie
545 del agar. Como se expresó anteriormente, una de las limitaciones del modelo
546 es la absorción a través de la cutícula, dada su dureza. Los resultados
547 obtenidos en estos experimentos podrían estar mostrando que la mayor
548 toxicidad de los extractos probablemente se deba a su ingreso con la comida, a
549 través de la faringe. La faringe es una bomba neuromuscular bilobulada que
550 succiona y tritura la comida antes de que pase al intestino donde se digiere. El
551 bombeo de la faringe está condicionado por la disponibilidad de comida, es más
552 rápido cuando está hambriento y menos cuando está saciado (Avery y You,
553 2012).

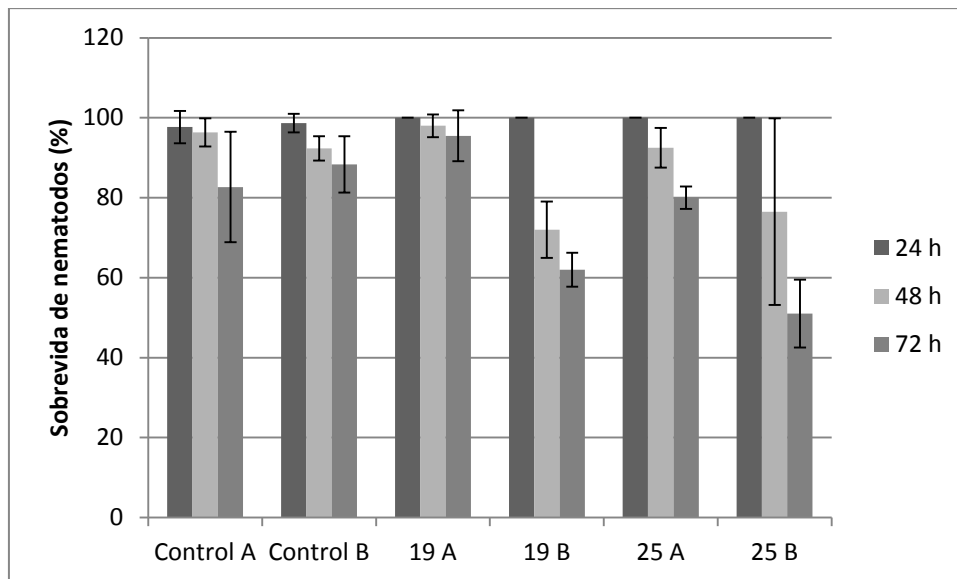
554 Se considera a *C. elegans* un buen modelo de toxicidad oral al agregar
555 sustancias de prueba a su alimento, y además una interfase de los ensayos *in*
556 *vitro* y las pruebas de toxicidad en mamíferos. Sin embargo tiene una gran
557 desventaja, que es la necesidad de prácticas de cultivo estandarizadas para
558 lograr resultados consistentes.

559 Este ensayo fue crucial para decidir el protocolo de exposición para el
560 modelo biológico en nuestro trabajo. Teniendo en cuenta estos resultados, en
561 los ensayos subsiguientes, los extractos fueron mezclados con las bacterias y
562 posteriormente agregados al medio de cultivo sólido.

563

564

565



566

567

Figura 10. Sobrevida de los nematodos a dos sistemas de exposición A) extracto en el medio NGM y B) extracto mezclado con la bacteria a 24, 48 y 72 h.

568

569

570 2.4. Ensayos de Toxicidad aguda

571

572

573

574

Los gusanos (entre 20-30 por placa) se incubaron en medios NGM con las distintas concentraciones de los extractos de hongos durante 24, 48 y 72 h (teniendo en cuenta que la sobrevivencia media de *C. elegans* es de 25 días) (Figura 11).



575

576

577

578

Figura 11. Nematodos *C. elegans* en estadios L4 y huevos desarrollándose en medio sólido NGM y sobre una capa de bacteria *E. Coli*.

579

580

Los ensayos se realizaron por duplicado y referidos al control con DMSO.

581

582

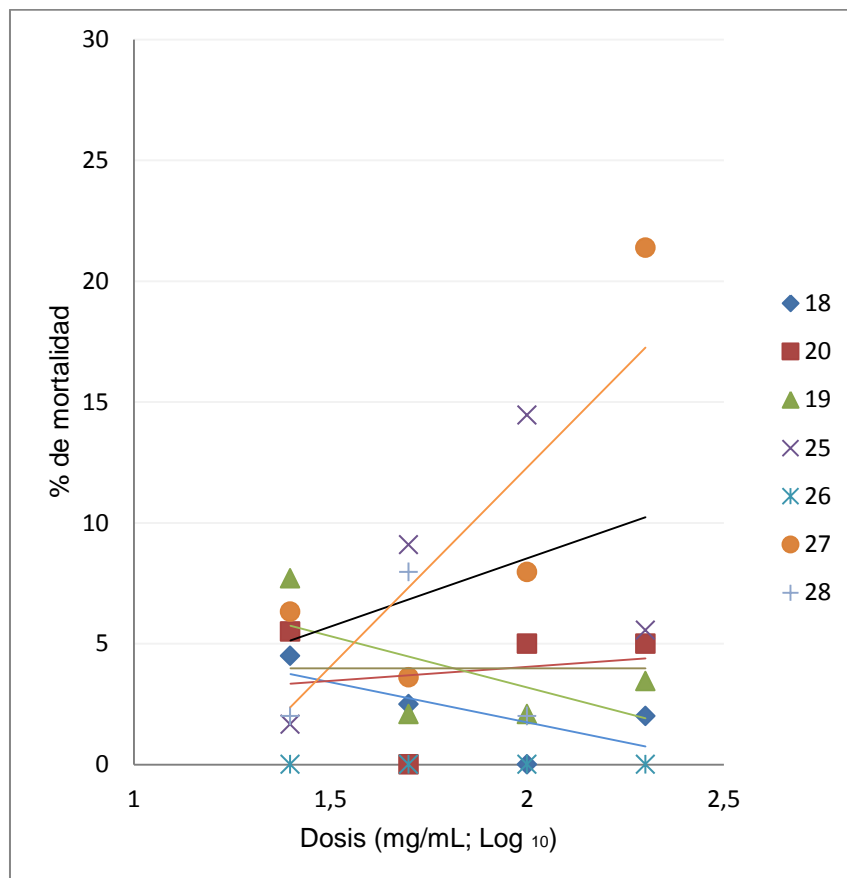
Al finalizar cada tiempo los gusanos fueron examinados bajo lupa estereoscópica para determinar el número de gusanos vivos y muertos. Los

583 gusanos que no se movieron después de repetidos contactos con el ansa
584 fueron considerados muertos. Con estos datos se determinaron los porcentajes
585 de mortalidad en la población y se construyeron curvas de dosis - respuesta a
586 diferentes tiempos para calcular las DL50 (Figura 12).

587 Los ensayos en este modelo no reemplazan el análisis de toxicidad en
588 mamíferos dado que los nematodos carecen de la mayoría de los órganos de
589 mamíferos. Sin embargo, son de utilidad como prueba inicial para predecir la
590 toxicidad dado que conservan muchas vías metabólicas y se ha demostrado
591 una buena correlación de los puntos finales en *C. elegans* con DL50 de
592 algunos mamíferos (rata).

593 ver

594 A)



595

596

597

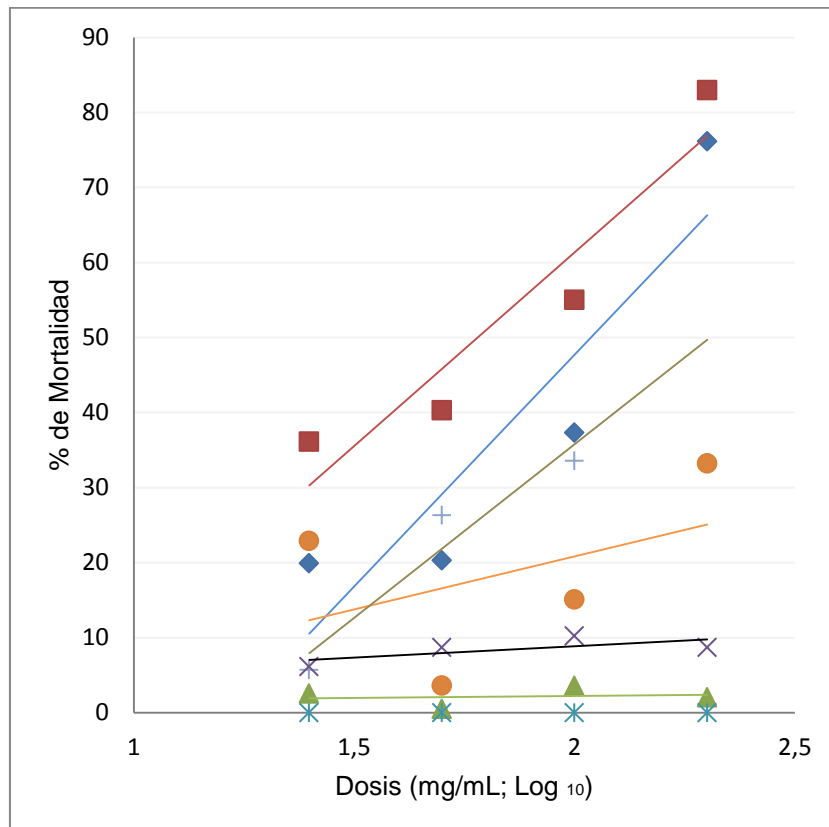
598

599

600

601
602

B)



603

Figura 12. Toxicidad letal aguda de los extractos de hongos sobre *C. elegans* a las 24 (A) y 72 horas de exposición (B).

604
605
606
607
608

En los ensayos de **Toxicidad aguda de 24 h** solamente los extractos 27 y 25 presentaron toxicidad letal con una DL50 estimada de 2×10^4 mg/mL y 2×10^9 mg/mL, respectivamente (Figura 12). El extracto 27 fue el que resultó más tóxico para los nematodos. Las DL10 de los extractos mencionados fueron de 72,44 mg/mL y 177,83 mg/mL, respectivamente.

613
614
615
616
617

En las pruebas de **Toxicidad aguda de 72 h**, todos los extractos presentaron toxicidad letal con excepción del extracto 26 y 19. Las dosis estimadas fueron para el extracto 20 DL50: 1,77 mg/mL, extracto 28 DL50: 2,30 mg/mL, extracto 27 DL50: 4,07 mg/mL, extracto 25 DL50: 15,49 mg/mL y el extracto 18 DL50: 109,65 mg/mL. El primero mostró mayor toxicidad sobre los gusanos a las 72 h de exposición.

619
620

El extracto 26 no produjo toxicidad en los tiempos evaluados.

621 **2.5 Ensayos de Toxicidad subletal**

622 Se evaluaron los efectos de una dosis subletal de los extractos fúngicos
623 (10 mg/mL) sobre los siguientes parámetros de los nematodos:

- 624 - Evolución
- 625 - Reproducción
- 626 - Crecimiento

627 Los resultados de los distintos tratamientos fueron comparados con el control
628 (DMSO). Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

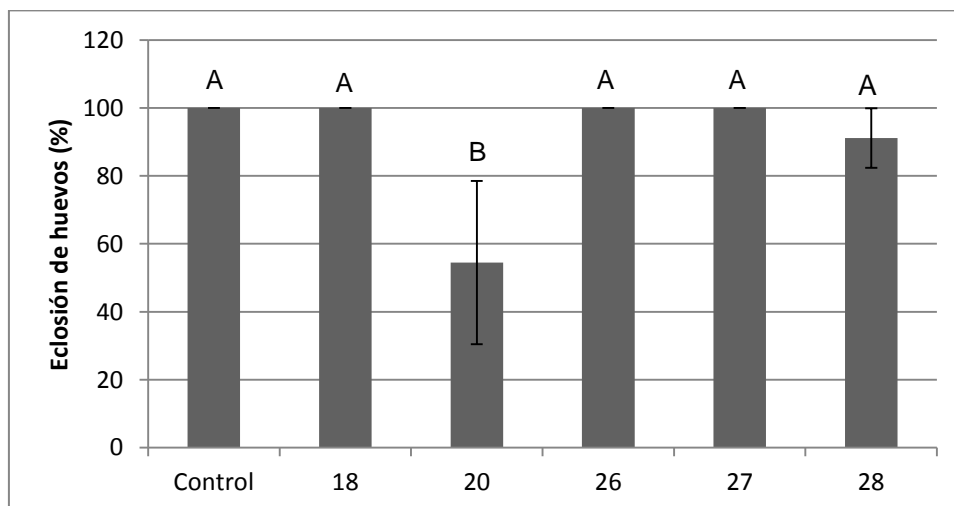
629

630 **2.5.1 Efecto sobre la evolución de los nematodos**

631 En primer lugar, se evaluó cómo afectaban los extractos el
632 desarrollo del embrión, a los fines de identificar posibles alteraciones en la
633 evolución, evidenciado por la incapacidad de eclosión de los huevos.

634 Los extractos 20 y 28 causaron reducciones de 44 y 8 % en la eclosión
635 de huevos respecto al control, respectivamente. Siendo estadísticamente
636 significativo solo el efecto causado por el extracto 20 (p-valor < 0,0006) (Figura
637 13).

638



639

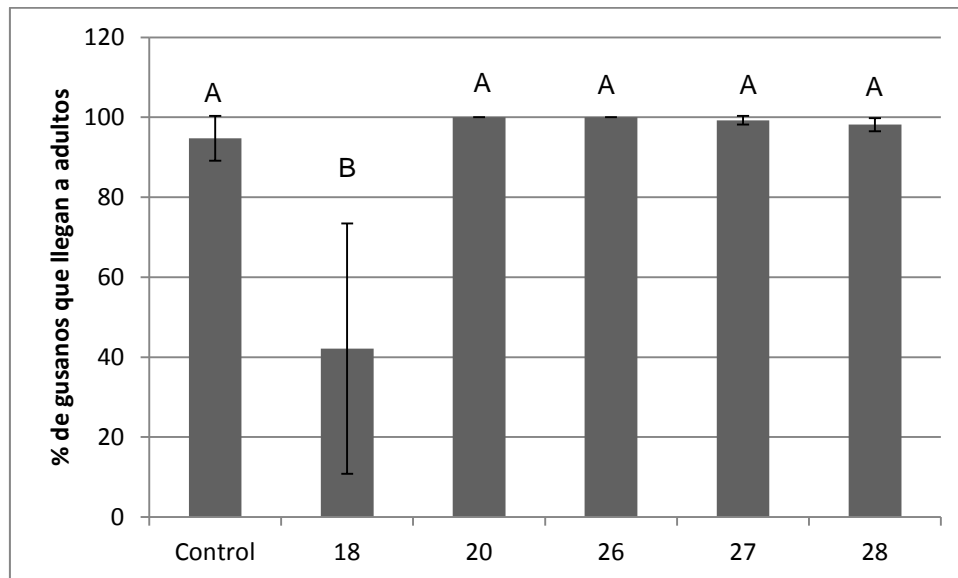
640 **Figura 13.** Efectos de los extractos fúngicos sobre la eclosión de
641 huevos del *C. elegans*.

642

643 En una instancia posterior se evaluaron los efectos de los extractos
644 sobre el desarrollo larvario, determinando el número de larvas que llegan a
645 adultos. En la Figura 14 se observa que sólo el extracto 18 causó una inhibición

646 significativa de 38 % de gusanos que llegan a adultos, considerando como 100
647 % al total de huevos eclosionados (p-valor < 0,0008).

648



649

650

Figura 14. Efecto de los extractos de hongos en la evolución de los nematodos a estadio adulto.

651

652

653

654

655

656

657

658

659

660

661

662

663

2.5.2 Efecto sobre la reproducción de los nematodos

664

665

666

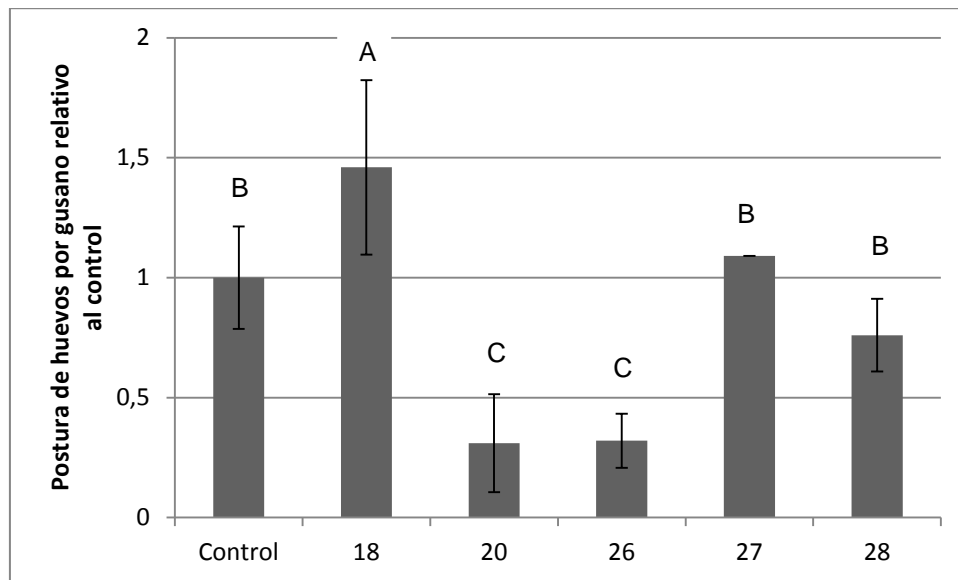
667

668

Para evaluar el efecto de los extractos en la reproducción de *C. elegans* se determinó el número de huevos que pone un individuo en 24 h. Para ello, se colocó un adulto joven (L3) por placa y luego de finalizado el tiempo de exposición, se retiró el adulto y se procedió al conteo de huevos. En el grupo control se registró un total de 54 huevos por gusano en el lapso de estudio.

669 En este estudio se observaron reducciones significativas de la postura
670 de huevos causadas por los extractos 20 (69 %), 26 (68 %), y 28 (24 %) de
671 reducción con respecto al control con DMSO (p-valor < 0,0001 para cada caso)
672 (Figura 15).

673



674

675

676

Figura 15. Efecto de los extractos sobre la reproducción de los nematodos.

677

2.5.3. Efecto sobre el crecimiento de los nematodos

678

679

680

Los efectos sobre el crecimiento de los nematodos fueron evaluados determinando la longitud de los gusanos adultos luego de exponer por 24 h los adultos jóvenes (L3) a los extractos.

681

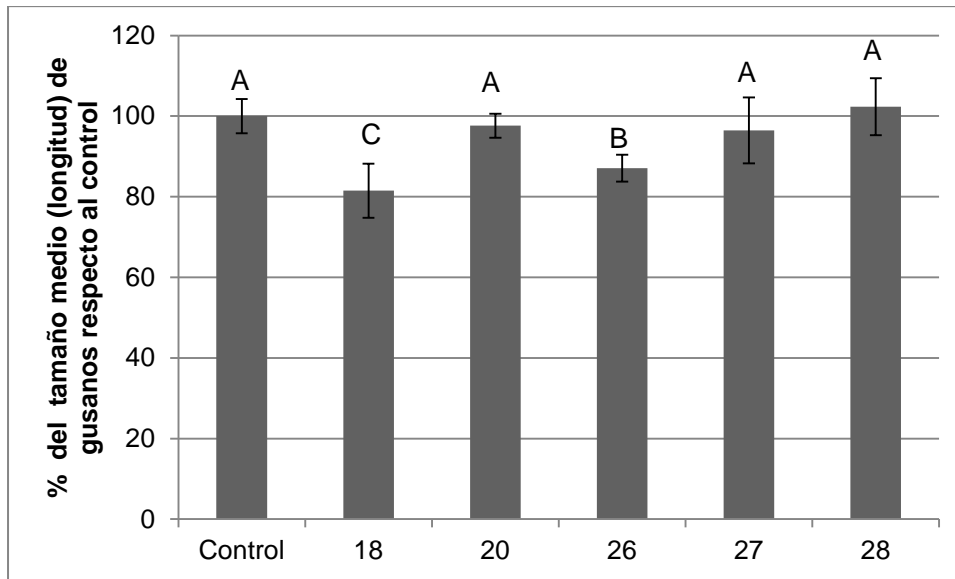
682

683

684

Los resultados mostraron que únicamente los extractos 18 y 26 redujeron significativamente la longitud de los gusanos adultos en 18 % y 13 % con respecto al control (p-valor < 0,0030 en ambos casos) respectivamente (Figura 16).

685



686

687 **Figura 16.** Efecto de los extractos sobre el crecimiento de los nematodos.

688

689 Tanto el crecimiento como la reproducción de los nematodos resultaron
 690 comprometidos por el orden *Mucoral*. En un trabajo previo se reportó que
 691 algunas especies de Mucorales presentaron toxicidad sobre el crustáceo
 692 *Artemia* o las plántulas de arveja y tabaco (Reiss, 1993). Recientemente se ha
 693 puesto atención en la inocuidad de algunos Mucorales empleados en la
 694 elaboración de alimentos, que albergan bacterias endosimbióticas como
 695 *Burkholderia* con capacidad patogénica y de producción de toxinas (Dolatabadi
 696 y col., 2016).

697 Los géneros fúngicos aislados en esta tesis, como mencionamos, son
 698 utilizados en la industria alimentaria en la fermentación de bebidas y en la
 699 producción de proteasas. Su uso en la producción de enzimas representa una
 700 gran ventaja, pues son extracelulares y esto simplifica su obtención (Alves y
 701 col., 2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo deja en evidencia la
 702 necesidad de velar por su inocuidad en los alimentos.

703

704

705

706

707

708

709

CONCLUSIÓN

710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729

Los resultados de este trabajo muestran que el 50 % de los hongos aislados de los alimentos presentaron efectos tóxicos sobre el modelo biológico empleado (*C. elegans*). Los aislamientos pertenecieron a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, ambos conocidos como micotoxigénicos y a un representante dentro de los Mucorales.

Todos los aislamientos de *Aspergillus* y *Penicillium* causaron toxicidad aguda, mientras que sólo algunos de ellos causaron efectos crónicos. Estas alteraciones podrían relacionarse a la producción de micotoxinas, aunque no se descartan las contribuciones de otros tipos de compuestos.

Además se observaron efectos de toxicidad crónica a nivel de la reproducción y el crecimiento del nematodo por un extracto de un *Mucoral*. Este es un hallazgo novedoso debido a los escasos estudios de toxicidad sobre este grupo de hongos, dejando en evidencia la necesidad de realizar un estudio más exhaustivo del potencial tóxico de los hongos Mucorales, muy empleados en la industria biotecnológica para la producción de enzimas, en la fermentación de bebidas y como causantes de grandes pérdidas económicas en precosecha y poscosecha de frutas.

ANEXO I

730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755

Publicaciones:

- Benito Nacir, M.J.; Theumer, M.G. y Asis, R. "Caracterización de la toxicidad de hongos alterantes de alimentos utilizando *Caenorhabditis elegans*". VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria y III Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria IAFP-Latino 2018 (IAFP's 6th Latin American Symposium on Food Safety). CABA, Buenos Aires, Argentina. Setiembre 25-27, 2018.
- Benito Nacir, M.J.; Carranza, A.V.; Moran, Y.; Theumer, M.G. y Asis, R. Caracterización de la toxicidad de hongos alterantes de alimentos utilizando *Caenorhabditis elegans*. Publitec. <https://www.publitech.com/2019/01/03/caracterizacion-de-la-toxicidad-de-hongos-alterantes-de-alimentos-utilizando-caenorhabditis-elegans/>

Premio:

- **PREMIO PUBLITEC al mejor trabajo de investigación con aplicación en la industria de alimentos.** Benito Nacir, M.J.; Theumer, M.G. y Asis, R. "Caracterización de la toxicidad de hongos alterantes de alimentos utilizando *Caenorhabditis elegans*". VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria y III Simposio Argentino de Inocuidad Alimentaria IAFP-Latino 2018 (IAFP's 6th Latin American Symposium on Food Safety). CABA, Buenos Aires, Argentina. Setiembre 25-27, 2018.

CARACTERIZACIÓN DE LA TOXICIDAD DE HONGOS ALTERANTES DE ALIMENTOS UTILIZANDO *CAENORHABDITIS ELEGANS*



INTRODUCCIÓN

Los alimentos representan una rica fuente de nutrientes para hongos filamentosos que, en condiciones óptimas, tienen un rápido desarrollo. Sin embargo, también son capaces de crecer frente a condiciones no favorables e incluso adversas, tales como pre-tratamientos, condiciones de almacenamiento, incorporación de aditivos, como ocurre en el procesamiento de los alimentos (Stoew, 2016; Almudena & Lizaso, 2001).

Se ha descrito un gran número de géneros de hongos filamentosos que contaminan alimentos. Dentro de estos géneros, hay especies que tienen funciones beneficiosas en la elaboración de alimentos y otras que producen alteraciones cualitativas y cuantitativas y/o depositan sustancias tóxicas o micotoxinas (Alshannaq & Yu, 2017). Las especies toxigénicas se incluyen en los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria* (Waskiewicz & Golinski, 2015). Sus micotoxinas pueden causar toxicidad aguda -con deterioro de órganos y pudiendo causar la muerte- o toxicidad crónica con efectos cancerígenos, mutagénicos y teratogénicos, por lo que representan el mayor riesgo de exposición para las poblaciones modernas (Alshannaq & Yu, 2017, Waskiewicz & Golinski, 2015).

Para evaluar la toxicidad se ha empleado una gran variedad de ensayos con animales (Hunt, 2016). Sin embargo, la toxicología moderna busca utilizar métodos alternativos al uso de animales (Romero

Trabajo ganador del Premio Publitec en el VI Simposio Latinoamericano de Inocuidad Alimentaria organizado por la CAIA/IFP

Benito Nacir, M.J.*; Carranza, A.V.; Moran, Y.; Theumer, M.G.; Asis, R.

Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI -
Facultad de Ciencias Químicas -
Universidad Nacional de Córdoba - CONICET.
Córdoba, Argentina.
*ramonasis@gmail.com

Fernández y col., 2016) para evitar el sufrimiento animal, reducir costos y lograr la predicción de los resultados en humanos. Una opción es utilizar un organismo modelo como el nematodo *Caenorhabditis elegans* (Antoshechkin & Stemberg, 2007; Kamath y col., 2003), que se puede mantener y expandir en condiciones de laboratorio con procedimientos relativamente sencillos y proporcionan datos -a diferencia de los modelos celulares o microorganismos- de un animal entero con propiedades digestivas, reproductivas, endócrinas, sensoriales y neuromusculares intactas y metabólicamente activas (Hunt, 2016).

A pesar del gran número de géneros de hongos que contaminan alimentos y de su gran capacidad de sintetizar metabolitos secundarios, existe poca información de la toxicidad de aquellos hongos alterantes de alimentos que no clasifican en la categoría de hongos micotoxigénicos. Aun cuando se encuentren en bajas concentraciones, algunas de estas sustancias pueden representar un riesgo potencial para la salud de la población, principalmente de aquellos países que no controlan estos contaminantes (Trigos y col., 2008; Ferratto y col., 2012).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el presente trabajo se empleó *C. elegans* como modelo predictivo para evaluar la potencial toxicidad de extractos de hongos alterantes de alimentos, aislados de productos de comercialización local tales como aceitunas negras y verdes, papaya, mandarina, tomate, pimiento, maíz, salame, pan, pan multicereal, chipá y pan criollo.

OBJETIVOS

Evaluar la toxicidad aguda y crónica de extractos de hongos alterantes de alimentos en un modelo experimental con *C. elegans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de extractos fúngicos

Para preparar los extractos fúngicos, hongos de diferentes alimentos visiblemente contaminados -comercializados en la ciudad de Córdoba- fueron aislados en placas de Petri con agar Sabouraud. La purificación fúngica se efectuó a partir de cultivos monospóricos en medios sólidos. Luego, los micelios se emplearon para la obtención de los extractos mediante el agregado de etanol absoluto, filtrado y posteriormente evaporados con corriente de nitrógeno. El extracto seco resultante fue disuelto en DMSO (a una concentración de 200 mg/mL), esterilizado mediante filtración (0,22 µm) y conservado a -80°C hasta su utilización.

Ensayos de exposición

Para el ensayo de toxicidad aguda se utilizó la cepa N2 var. Bristol de *C. elegans* en estadio larvario L4 (Figura 1). Los gusanos se incubaron en medios NGM con las



FIGURA 1 - Imagen de nematodos *C. elegans* en estadios L4 y huevos desarrollándose en medio sólido NGM y sobre una capa de bacteria *E. coli*.

ALQUILER Y VENTA DE EQUIPOS INDUSTRIALES
INGENIERÍA EN FLUIDOS

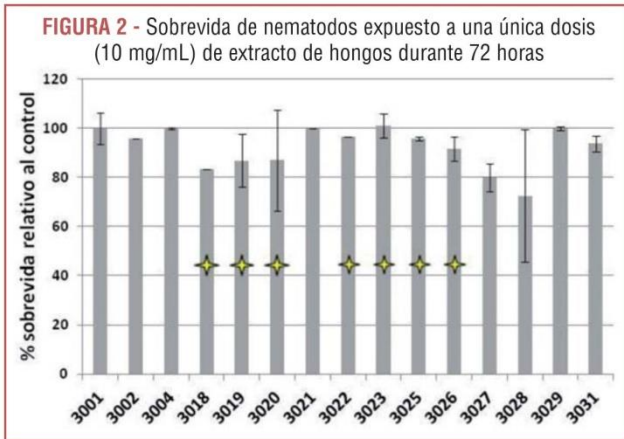
Filtrado y tratamiento de aguas brutas y efluentes:

- Podemos filtrar agua desde 5 micrones en adelante sin límites de caudal.
- Filtros de malla y de anillas, automáticos y auto limpiantes:
 - Ocupan espacio reducido
 - Baja pérdida de presión en el circuito
 - Bajo caudal de limpieza
 - Programables según variables del usuario
 - Muy bajo costo de mantenimiento



Filtros manuales para caudales desde 5 a 50 m³/h

Juan J. Paso 7410 (2000) Rosario - Tel.: (54 341) 525-3653 / (0341) 155068062 - contacto@ecoflowsrl.com.ar - www.ecoflowsrl.com.ar



determinó el porcentaje de sobrevida en la población y se construyeron curvas dosis-respuesta a diferentes tiempos para calcular la DL50.

La toxicidad crónica se evaluó considerando el efecto sobre el desarrollo, crecimiento y reproducción, de gusanos expuestos a una concentración subletal de los extractos (10 mg/mL). Para el efecto en el desarrollo, huevos de *C. elegans* fueron expuestos al extracto durante 96 horas y posteriormente se cuantificó el porcentaje de huevos que eclosionaron y el porcentaje de gusanos que llegaron a adultos. Para estudiar el efecto

sobre crecimiento, gusanos adultos jóvenes (L3) fueron expuestos 24 horas al extracto y se cuantificó la longitud corporal por microscopía. Para evaluar el efecto sobre la reproducción, gusanos adultos jóvenes (L3) fueron expuestos individualmente al extracto durante 24 horas y con posterior cuantificación de postura de huevos. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y referidos al control expuesto a DMSO.

Análisis estadístico

Se utilizó el test de ANOVA con el software estadístico INFOSTAT versión 2017p (Universidad Nacional de Córdoba). Las diferencias significativas fueron con un $p < 0.05$.

RESULTADOS

Previo a los ensayos de toxicidad aguda y crónica, se evaluó la toxicidad letal de 15 extractos (a una concentración de 10 mg/ml) correspondientes a aislamientos de hongos de diferentes fuentes alimentarias. De este estudio se detectaron siete extractos con capacidad de producir mortalidad en la población de *C. elegans* superior al control en un periodo de 72 h (Figura 2). La identificación de los hongos reveló que tres aislamientos pertenecían al género *Penicillium* (Pen-3018, Pen-3019 y Pen-3028), tres pertenecían al género *Aspergillus* (Asp-3020, Asp-3025 y Asp-3027), y uno de ellos correspondía al orden de los Mucorales (Muc-3026) (Figura 3).

En los ensayos de toxicidad aguda de 24 horas, solamente los extractos Asp-3027 y Asp-3025 presentaron toxicidad letal con una DL50 estimada de 2×10^4 mg/mL y 2×10^9 mg/mL, respectivamente (Figura 4a). El extracto Asp-2027 fue el que resultó más tóxico para los nematodos.

En los ensayos de toxicidad aguda de 72 horas (Figura 4b), todos los extractos presentaron toxicidad letal con excepción del extracto Muc-3026 y Pen-3019. Las dosis estimadas ordenados de mayor a menor toxicidad fueron Asp-3020 DL50: 1,77 mg/mL, Pen-3028 DL50: 2,30 mg/mL, Asp-3027 DL50: 4,07 mg/mL, Asp-3025 DL50: 15,49 mg/mL y Pen-3018 DL50: 109,65 mg/mL.

En los ensayos de toxicidad crónica, el desarrollo del nematodo se vio afectado por los extractos Asp-3020 y Pen-3028, que

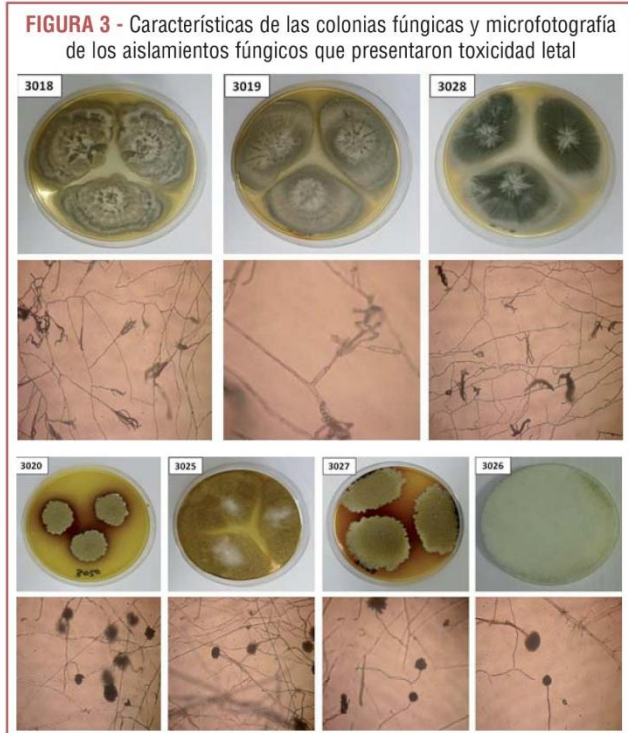


FIGURA 4a- Curva dosis respuesta de toxicidad letal de los extractos de hongos sobre *C. elegans* expuestos 24 horas

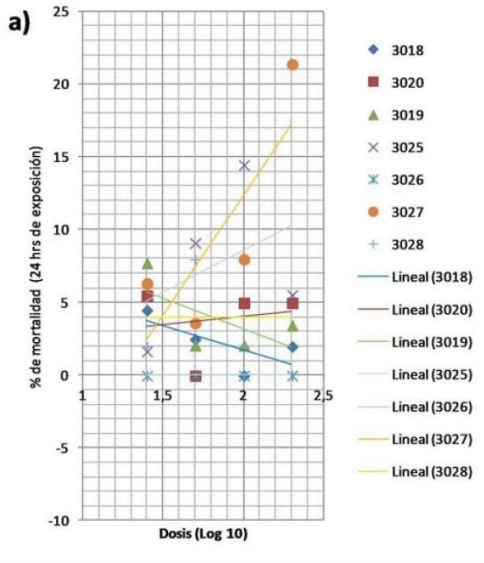
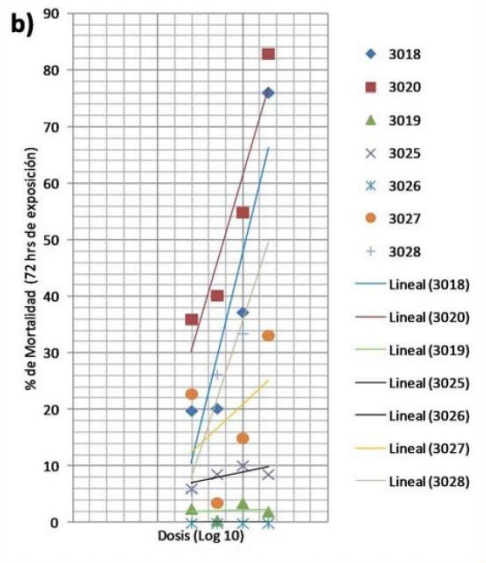


FIGURA 4b- Curva dosis respuesta de toxicidad letal de los extractos de hongos sobre *C. elegans* expuestos 72 horas.





CERSA

CENTRO ENOLÓGICO RIVADAVIA S.A.

COMERCIALIZACIÓN Y DISTRIBUCIÓN EN ARGENTINA Y LATINOAMÉRICA DE PRODUCTOS QUÍMICOS PARA LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA

François Frères
TONNELLERIE

Rousselot
a Sobel Company

TATE & LYLE
CONSISTENTLY FIRST IN SUSTAINABLE INNOVATIONS

SOLVAY

FERMITAN TANINOS
Quebracho, Roble, Acacia, Uva...

CERSA IMPORTACIÓN

- Acido Cítrico
- Carbón Activado
- Carbonato e H. de Potasio
- Metabisulfito de Potasio
- Metabisulfito de Sodio
- Sorbato de Potasio

MENDOZA

Tels.: 54 (0261) 4932626 / 2666 / 2502 - mendoza@centro-enologico.com
Maza Norte 3237 Gutiérrez (5511) Maipú, Mendoza.

• CERSA atiende directamente las siguientes zonas en Argentina:
Neuquén, San Luis, San Juan, La Rioja, Salta, Tucumán, Catamarca y Jujuy.

DEXTROGUM Y LEVOGUM
GOMAS ARÁBIGAS

VINTAGE

- Bisulfito de Amonio
- Bisulfito de Potasio

Henkel
Adhesive Technologies

AB Enzymes
an ABF Experience Company

AB MAURI

BASF
The Chemical Company

CALIDAD DE PRODUCTO, SERVICIO, SEGURIDAD Y EXPERIENCIA

WWW.CENTROENOLOGICO.COM.AR



FIGURA 5 - Efecto de los distintos extractos de hongos sobre la eclosión de huevos del *C. elegans*.

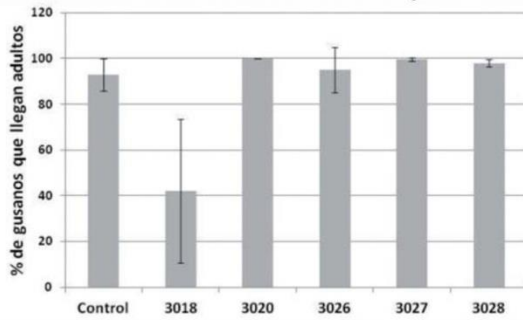
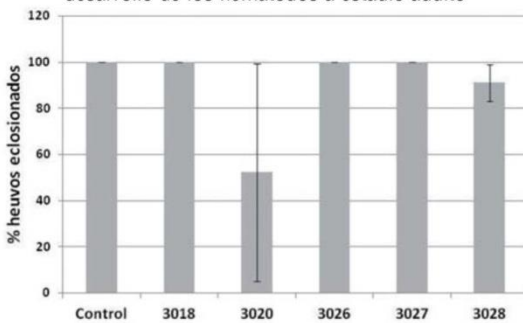


FIGURA 6 - Efecto de los extractos de hongos en el desarrollo de los nematodos a estadio adulto



mostraron una reducción significativa del 44% y del 8% en la eclosión de huevos con respecto al control (Figura 5). Del total de huevos eclosionados, sólo el extracto Pen-3018 presentó una inhibición significativa de 38% de gusanos que llegan a adultos (Figura 6). Los efectos sobre la reproducción fueron observados por una reducción significativa sobre la postura de huevos de un 69% en Asp-3020, 68% en Muc-3026 y 24% en Pen-3028 (Figura 7).

Los efectos sobre el crecimiento de los nematodos fueron evidenciados en una reducción significativa de 18% en la longitud del gusano adulto por los extractos Pen-3018 y del 13% por Muc-3026, respectivamente (Figura 8).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El modelo de *C. elegans* para estudiar la toxicidad de hongos contaminantes de alimentos permitió evidenciar efectos de toxicidad letal, sobre el desarrollo y reproducción de ese organismo. Los resultados obtenidos muestran que el 50% de los hongos aislados de los alimentos presentaron efectos tóxicos sobre *C. elegans*. Los hongos aislados pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y a un representante dentro de los Mucorales.



35 AÑOS DE CALIDAD

BIOTEC
Tecnología en alimentos



Lavalle 1125 (1048) Buenos Aires, Argentina Tel: +(5411) 4382-8332 biotec@biotecs.com.ar www.biotecs.com.ar

FIGURA 7 - Efecto de los extractos sobre la reproducción de los nematodos

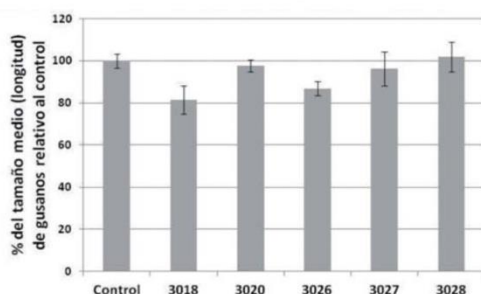
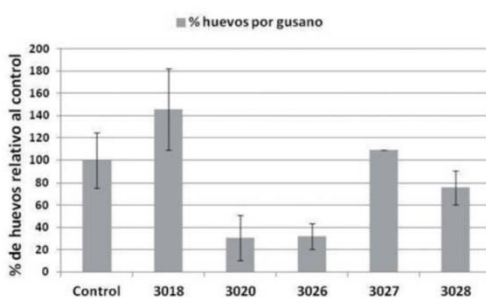


FIGURA 8 - Efecto de los extractos de hongos sobre el crecimiento de los nematodos



Los efectos de toxicidad aguda fueron observados en todos los aislamientos de *Aspergillus* y *Penicillium*, mientras que los efectos crónicos sólo en algunos de ellos.

Los efectos tóxicos observados en los aislamientos de estos géneros podrían relacionarse a la producción de micotoxinas que deberán comprobarse en un estudio posterior.

Se observaron efectos de toxicidad crónica por un extracto de un Mucoral. Este es un hallazgo novedoso debido a los escasos estudios de toxicidad sobre este grupo de hongos. Un trabajo previo reportó que algunas especies de Mucorales presentaron toxicidad sobre el crustáceo *Artemia* o las plántulas de arveja y tabaco (Reiss, 1993). Recientemente se ha puesto atención en la inocuidad de algunos Mucorales empleados en la elaboración de alimentos que albergan bacterias endosimbióticas, como *Burkholderia*, con capacidad patogénica y de producción de toxinas (Dolatabadi y col., 2016). Estos hallazgos junto a los resultados de este trabajo ponen en evidencia la necesidad de realizar un estudio más exhaustivo del potencial toxigénico de los hongos Mucorales.

BIBLIOGRAFÍA

- Alshannaq, A., & Yu, J. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6): 1-20.
- Almudena, A. & Lizaso, J. (2001). Hongos y Micotoxinas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid (pp. 1-3).
- Antoshechkin, I. & Stenberg P.W. (2007). The versatile worm: genetic and genimic resources for *Caenorhabditis elegans* research. *Nat. Rev. Genet.* 8: 518 - 532.
- Dolatabadi, S., Scherlach, K., Figge, M., Hertweck, C., Dijksterhuis, J., Menken, S. B. J., & de Hoog, G. S. (2016). Food preparation with mucoralean fungi: A potential biosafety issue? *Fungal Biology*, 120(3): 393-401.
- Ferratto, J.; Firpo, I; Ortiz, M; Rotondo, R. & Beltran, C. (2012). Pérdidas poscosecha de hortalizas en negocios minoristas, con distintos sistemas de manejo, en Rosario, Santa Fe, Argentina. *Horticultura Argentina*, 31(75): 21-27.
- Hunt, P.R. (2016). The *C.elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied Toxicology*, 37: 50-59.
- Kamath, R.S.; Fraser, A.G.; Dong, Y.; Poulin, G.; Durbin, R.; Gotta, M.; Kanapin, A.; Le Bot, N.; Moreno, S.; Sohrmann, M.; Welchmann, D.P.; Zipperlen, P. & Ahringer, J. (2003). Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature*, 421: 231-237.
- Reiss, J. (1993). Biotoxic activity in the mucorales. *Mycopathologia*, 121(2): 123-127.
- Romero Fernández, W.; Batista Castro, Z.; De Lucca, M.; Ruano, A.; García Barceló, M.; Rivera Cervantes, M.; García Rodríguez, J. & Sánchez Mateos, S. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(2): 288-299.
- Stoev, S. D. (2016). Food security and foodborne mycotoxicoses, risk assessment, preventive measures, and underestimated hazard of masked mycotoxins or joint mycotoxin interaction. *Food toxicology* (pp. 169-199).
- Trigos, A; Ramírez, K. y Salinas, A. (2008). Presencia de hongos filamentosos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*, 28: 125-129.
- Wa•kiewicz, A., & Golinski, P. (2015). Mycotoxins in cereals and cereal products: Occurrence, toxicity and prevention. *Mycotoxins: Occurrence, toxicology and management strategies* (pp.97-133).

CONTROL DE PLAGAS EN LA INDUSTRIA

Dir. Tec. Ing. Agr. Gustavo Iván Adamec

Manejo Integrado de Plagas (MIP)

para la Industria Alimenticia y/o Farmacéutica.

HABILITACIONES: Municipales, Provinciales y Nacionales

SERVICIOS AMBIENTALES BUENOS AIRES S.R.L.

La Roche 839 - Morón (1708) Buenos Aires.

Tel. 4627-1313

info@fumigadorasaba.com.ar



www.fumigadorasaba.com.ar

BIBLIOGRAFÍA

769
770

771 - Anderson, G.L.; Cole, R.D. and Williams, P.L. (2004). Assessing behavioral
772 toxicity with *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and Chemistry*,
773 23(5): 1235-1240.

774 - Anatomía de un adulto hermafrodita (A), y de un macho (B) de *C. elegans*.
775 Recuperado de
776 <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>

777 - Alshannaq, A., and Yu, J. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major
778 mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public*
779 *Health*, 14(6):1-20.

780 - Alves, M.H.; M. de Campos-Takaki, G.; Okada, K.; Ferreira Pessoa, I.H. y
781 Milanez, A.I. (2005). Detección de proteasa extracelular en especies de *Mucor*.
782 *Revista Iberoamericana de Micología*, 22:114-117.

783 - Arenas, R. (2014). Hongos. *Micología Médica ilustrada*, 18-36. México.
784 McGraw Hill Interamericana editores.

785 - Avery, L. and You, Y.J. (2012). *C. elegans* feeding. *WormBook*. Recuperado
786 de <http://www.wormbook.org>.

787 - Basílico, J.C. (2001). Hongos toxigénicos y micotoxinas. *Revista FABICI*, 5:
788 201-208.

789 - Características fenotípicas de los estadios larvarios de la cepa silvestre N2.
790 Recuperado de
791 <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>

792 - Cardozo de Martínez, C.A. y Mrad de Osorio, A. (2008). Ética en
793 investigación con animales: Una actitud responsable y respetuosa del
794 investigador con rigor y calidad científica. *Revista latinoamericana de Bioética*
795 ISSN 1657-4702, 8(15):46-71.

796 - Chulze, S.N. (2013). Micotoxinas: contaminación natural en alimentos para
797 cerdos y efectos en la producción porcina. Departamento de Microbiología e
798 Inmunología, Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales,
799 Universidad nacional de Río Cuarto. Córdoba. Argentina. Recuperado de
800 <http://www.engormix.com>.

801 - Ciclo de vida de *C. elegans* a 22 °C. Recuperado de
802 <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/mainframe.htm>

803 - Dhawan, R.; Dusenbery, D. and Williams, P. (1999). Comparison of lethality,
804 reproduction, and behavior as toxicological endpoints in the nematode
805 *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Toxicology and Environment Health .Part A*,
806 58:451-462.

807 - Dimitriadi, M. and Hart, A. (2010). Neurodegenerative disorders: insights from
808 the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of disease*, 40(1):4-11.

809 - Dolatabadi, S.; Scherlach, K.; Figge, M.; Hertweck, C.; Dijksterhuis, J.;
810 Menken, S. B. J. and de Hoog, G.S. (2016). Food preparation with mucoralean
811 fungi: A potential biosafety issue? *Fungal Biology*, 120(3):393-401.

812 - Ferratto, J; Firpo, I; Ortiz, M; Rotondo, R. y Beltran, C. (2012). Pérdidas
813 poscosecha de hortalizas en negocios minoristas, con distintos sistemas de
814 manejo, en Rosario, Santa Fe, Argentina. *Horticultura Argentina*, 31(75):21-27.

815 - Garcia Sancho, M. (2012). From the genetic to the computer program: the
816 historicity of 'data' and 'computation' in the investigations on the nematode
817 worm *C. elegans* (1963 - 1998). *Studies in History and Philosophy of Biological
818 and Biomedical Sciences*, 43(1):16-28.

819 - Giles, A.C. and Rankin, C.H. (2009). Behavioral and genetic characterization
820 of habituation using *Caenorhabditis elegans*. *Neurobiology of Learning and
821 Memory*, 92(2):139-146.

822 - Godínez, S.; Calderón, M. y Rodríguez, Y. (2010). Influencia de las
823 condiciones de cultivo en la elaboración de un inóculo fúngico. *Ciencia y
824 tecnología de los Alimentos*, 20(1): 57-60.

825 - Hartung, T. 2009. Toxicology for the twenty-first century. *Nature*, 460:208-
826 212.

827 - Höss, S.; Menzel, R.; Gessler, F.; Nguyen, H.T.; Jehle, H.A. and
828 Traunspurger, W. (2013). Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins)
829 produced by genetically modified maize (Bt maize) on the nematode
830 *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 178:147-151.

831 - Hunt, P.R. (2016). The *C.elegans* model in toxicity testing. *Journal of Applied
832 Toxicology*, 37:50-59.

833 - Knight, A.W.; Little, S.; Houck, K.; Dix, D.; Judson, R.; Richard, A.; McCarroll,
834 N.; Akerman, G.; Yang, C.; Birrell, L. and Walmsley, R.M. (2009). Evaluation of
835 high-throughput genotoxicity assays used in profiling the US EPA ToxCast
836 Chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 55:188-199.

837 - Martínez Padrón, H. Y.; Hernández Delgado, S.; Reyes Méndez, C. A. and
838 Vázquez Carrillo, G. (2013). El Género *Aspergillus* y sus Micotoxinas en Maíz
839 en México: Problemática y Perspectivas. Revista mexicana de
840 fitopatología, 31(2):126-146. Recuperado de
841 [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200005&lng=es&tlng=es)
842 [33092013000200005&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092013000200005&lng=es&tlng=es)

843 - Megalou, E. and Tavernarakis, N. (2009). Autophagy in *Caenorhabditis*
844 *elegans*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). Molecular Cell Research,
845 1793(9):1444-1451.

846 - Meyer, J.; Lord, C.; Yang, X.; Turner, E.; Badireddy, A.; Marinakos, S.;
847 Chilkoti, A.; Wiesner, M. and Auffan, M. (2010) Intracellular uptake and
848 associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. Aquatic
849 Toxicology, 100(2):140-150.

850 - Miranda, J.P.; Leite, S.B.; Muller Vieira, U.; Rodrigues, A.; Carrondo, M.J. and
851 Alves, P.M. (2009). Towards an extended functional hepatocyte in vitro culture.
852 Tissue Engineering Part C: Methods, 15:157-167.

853 - Muñoz, D.J.; Rodríguez, R.; Mota, J.J. y Suarez, R.L. (2015). Aislamiento e
854 identificación de hongos filamentosos en alimentos concentrados para
855 mascotas domésticas (perros y gatos). Revista Científica FCV-LUZ, 25(6):432-
856 438.

857 - Nass, R. and Hamza, I. (2007). The nematode *C. elegans* as an animal model
858 to explore toxicology in vivo: solid and axenic growth culture conditions and
859 compound exposure parameters. Current Protocols in Toxicology
860 Chapter1:Unit1 9 doi: 10.1002/0471140856.tx0109s31.

861 - Lado, J.; Luque, E.; Blanco, O. y Pérez Faggiani, E. (2011). Evaluación de
862 alternativas para el control poscosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum*
863 resistentes a imazalil. Agrociencia Uruguay, 15(1):55-63. Recuperado de
864 [http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482011000100007&lng=es&tlng=es)
865 [15482011000100007&lng=es&tlng=es.](http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2301-15482011000100007&lng=es&tlng=es)

866 - Leal, D.; Pico, Y.; Castro, J.; Guerra, J. y Castro, G. (2011). Producción de
867 ácido cítrico a partir de suero lácteo entero e hidrolizado con *Aspergillus niger*,
868 por vía fermentativa. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y
869 Tecnología de Alimentos, 19(19):1-7.

870 - L'Hernault, S.W. (2009). The genetics and cell biology of spermatogenesis in
871 the nematode *C. elegans*. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 306(1-2): 59-
872 65.

873 - Li, A.P.; Lu, C.; Brent, J.A.; Pham, C.; Fackett, A.; Ruegg, C.E. and Silber,
874 P.M. (1999). Cryopreserved human hepatocytes: characterization of drug-
875 metabolizing enzyme activities and applications higher throughput screening
876 assay for hepatotoxicity, metabolic stability, and drug–drug interaction potential.
877 *Chemico - Biological Interaction*, 121:17-35.

878 - Londoño EM, Martínez MM. (2017). Aflatoxinas en alimentos y exposición
879 dietaria como factor de riesgo para el carcinoma hepatocelular. *Revista*
880 *Biosalud*, 16(1):53-66 DOI: 10.17151/biosa.2017.16.1.7.

881 - Olson, H; Betton, G; Robinson, D; Thomas, K; Monro, A; Kolaja, G; Lilly, P;
882 Sanders, J; Sipes, G; Bracken, W; Dorato, M; Van Deun, K; Smith, P; Berger,
883 B and Heller, A. (2000). Concordance of Toxicity of pharmaceuticals in humans
884 and in animals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 32:56-67.

885 - Ponton, J.; Moragues M. D.; Gené, J.; Guarro, J. y Quindós, G. (2002).
886 Hongos y Actinomicetos alérgicos. *Revista iberoamericana de Micología*,
887 1-18.

888 - Porta de la Riva, M.; Fontrodona, L.; Villanueva, A. and Cerón, J. (2012).
889 Basic *Caenorhabditis elegans* Methods: Synchronization and Observation.
890 *Journal of Visualized Experiments*, 64:1-9.

891 - Reiss, J. (1993). Biotoxic activity in the mucorales. *Mycopathologia*,
892 121(2):123-127.

893 - Rendueles, M. y Díaz, M. (2014). *Biotechnología Industrial*. *Arbor*, 190
894 (768):a155. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.3989/arbor.2014.768n4009>

895 - Roh, J.Y. and Choi, J. (2008). Ecotoxicological Evaluation of chlorpyrifos
896 exposure on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and*
897 *Environment Safety*, 71:483-489.

898 - Romero Fernández, W.; Batista Castro, Z.; De Lucca, M.; Ruano, A.; García
899 Barceló, M.; Rivera Cervantes, M.; García Rodríguez, J. y Sánchez Mateos, S.
900 (2016). El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio. *Revista*
901 *Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 33(2):288-299.

902

903 - Ruiz García, M.; Ramírez de Lara, M.C. y Antolín Giraldo, G. (2011). Efecto
904 del hidroximetil furfural sobre el crecimiento de hongos en pan de molde.
905 Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias - UNR, 18:27-
906 31. Recuperado de
907 [http://www.cienciasagronomicas.unr.edu.ar/journal/index.php/agronom/article/vi](http://www.cienciasagronomicas.unr.edu.ar/journal/index.php/agronom/article/view/19/24)
908 [ew/19/24](http://www.cienciasagronomicas.unr.edu.ar/journal/index.php/agronom/article/view/19/24).

909 - Santillán Mendoza, R.; Rodríguez Alvarado, G.; Fernández Pavía, S.P.;
910 Vázquez Marrufo, G.; Montero Castro, J.C. y Benítez Malvido, J. (2017).
911 Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública? Revista digital
912 universitaria, 18(6).
913 http://www.revista.unam.mx/vol.18/num6/art46/PDF_art46.pdf

914 - Scott, C.W.; Peters, M.F. and Dragan, Y.P. (2013). Human induced pluripotent
915 stem cells and their use in drug discovery for toxicity testing. Toxicology
916 Letters, 219:49-58.

917 - Serrano Colli, H.A. y Cardona Castro, N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas:
918 generalidades y aspectos básicos. Revista CES Medicina, 29(1):143-152.

919 - Stiernagle, T. (2006). Maintenance of *C. elegans*. WormBook: The Online
920 Review of *C.elegans* Biology, 1-11.

921 - Suárez Esquivel, M. y Estrada König, S. (2013). Bienestar animal en
922 investigación biomédica. Revista de Ciencias Veterinarias, 29(1):21-35.

923 - Tice, R.R.; Austin, C.P.; Kavlock, R.J. and Bucher, J.R. (2013). Improving the human
924 hazard characterization of chemicals: a Tox21 update. Environmental Health
925 Perspectives, 121:756-765.

926 - Tralau, T.; Riebeling, C; Pirow, R; Oelgeschlager, M; Seiler, A; Liebsch, M and
927 Luch, A. (2012). Wind of change challenges toxicological regulators.
928 Environmental Health Perspectives, 120:1489-1494.

929 - Trigos, A.; Ramírez, K. y Salinas, A. (2008). Presencia de Hongos
930 filamentosos en frutas y hortalizas y su relación en la Seguridad Alimentaria.
931 Revista Mexicana de Micología, 28:125-129.

932 - Wang, X¹.; Wang, X.; Li, L. and Wang, D. (2010). Lifespan extension in
933 *Caenorhabditis elegans* by DMSO is dependent on sir-2.1 and daf-16.
934 Biochemical and Biophysical Research Communications, 400(4):613-618.

935 - Waśkiewicz, A., and Golinski, P. (2015). Mycotoxins in cereals and cereal
936 products: Occurrence, toxicity and prevention. *Mycotoxins: Occurrence,*
937 *toxicology and management strategies*, 97-133.

938 - Winn, W.C.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Procop, G.W.;
939 Schrenckenbereger, P.C. y Woods; G.L. (2008). *Micología. Diagnóstico*
940 *Microbiológico*, 1102-1107. Argentina. Editorial médica Panamericana.

941 - Williams, P. and Dusenbery, D. (1990). Aquatic toxicity testing using the
942 nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Toxicology and Chemistry*,
943 9(10):1285-1290.

944 - Zhuang, Z.; Zhao, Y.; Wu, Q.; Li M, Liu, H.; Sun, L.; Gao, W. and Wang, D.
945 (2014). Adverse effects from clenbuterol and ractopamine on nematode
946 *Caenorhabditis elegans* and the underlying mechanism. *PLoS One*, 9(1): e
947 85482. Recuperado de <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085482>

948

949