



Maestría en Micología Médica

# NIVELES DE OCRATOXINA A EN PACIENTES DIALIZADOS DE LA CIUDAD DE POSADAS

Maestrando: Ernesto Velázquez.

Directora: Gladis Jerke

Codirectora: María Celina Vedoya.

2023



*“Soy todos los pasos valientes de mis abuelas, su latir furioso que dio vueltas la tierra,  
partió los muros y estalló al silencio hasta vencerlo entero.*

*Soy todos los pájaros de humo tejidos en su aire, nacidos para buscarme.*

*Soy la terquedad de mis abuelos, su semilla sedienta y justa, la profecía imposible de sus  
libros y el mar lejano de su niñez.*

*Soy los ojos de mi madre, el fuego de su sangre el eco de su esperanza.*

*Soy las manos buenas de mi padre hechas cuna, soy la carcajada más alta del mundo en  
una foto sobre sus hombros.*

*Soy todas las esquinas de esta ciudad de candiles y tempestades y cicatrices y alas, sus  
30.000 ausencias ardiendo, viviendo en los brazos que sostienen los carteles que me  
hacen ser quién soy.”*

*Tabaré Cardozo. Soy.*

*“Sonen al vent cançons de llibertat*

*Són la resposta de tot un poble despert*

*Seguim tossudament alçats*

*Venim a capgirar la història*

*No deixarem de caminar*

*Per la memòria dels que van lluitar primer*

*Per les que arribaran demà,*

*Tothom al carrer!”*

*Txarango. Cançons de llibertat.*



Dedicada...

... a mis mapadres Lahilda, Aníbal y Titina.

... a mi hermano Joaquín, que es valiente. A la Cami.

... a los compañeros y compañeras detenidas por razones políticas, juventud maravillosa.

... a los 30 mil compañeros y compañeras detenidos desaparecidos; presentes: ¡Aquí estamos de pie!



Agradecimientos.

A mis directoras Gladis y Celina, las directoras.

A mis amigas de Micología: Ñeca, Miriam y Vanesa.

A Lili, Graciela, Emanuel, Angi y Sebastián, que nos dieron alojamiento.

A mis compañeras y compañeros del Laboratorio de Ciencias Forenses: Carlitos, Patricia, Diego, Ianina, Claudia, Joselo, Blanca y Olga, a todas y todos.

A mis amigos y amigas los Dinos, a los del Barrio, a Ana, Vanesa y Andrea, a las *Rainhas da Favela*. A Ana, por su colaboración en el laboratorio.

A la universidad pública argentina, gratuita y de calidad.

A mi familia por todo.





## Contenido

---

Resumen. ....	3
Abstract. ....	7
1. Introducción. ....	11
1.1. Micotoxinas .....	14
1.2. Clasificación. ....	15
1.3. Producción de micotoxinas. ....	19
1.4. Hongos productores de micotoxinas. ....	21
1.5. Ocratoxina A.....	29
2. Justificación o problemática de tema. ....	37
3. Hipótesis.....	38
4. Objetivos. ....	39
5. Materiales y métodos. ....	40
5.1. Tipo de estudio. ....	40
5.2. Población en estudio. ....	40
5.3. Muestreo. ....	40
5.4. Análisis de Ocratoxina A .....	40
5.5. Hábitos alimentarios. ....	43
5.6. Análisis de datos. ....	43
6. Resultados.....	44
6.1. Niveles de ocratoxina A.....	44
6.2. Encuesta alimentaria.....	47
7. Discusión. ....	49
8. Conclusiones. ....	55
• Consideraciones finales. ....	55
9. Perspectivas a futuro. ....	56

10. Bibliografía.....	57
11. Anexos. ....	63
11.1. Anexo 1. Nombre IUPAC de aflatoxinas.....	63
11.2. Anexo 2. Tabla A1. Propiedades fisicoquímicas de aflatoxinas. ....	64
11.3. Anexo 3. Acta de consentimiento informado. ....	65
11.4. Anexo 4. Planilla de la encuesta alimentaria.....	66
11.5. Anexo 5. Certificado de calidad del Test de ELISA. ....	67
11.6. Anexo 6. Tabla pacientes-niveles de OTA-encuesta alimentaria. ....	68

## Resumen.

Las micotoxinas son compuestos químicos tóxicos de bajo peso molecular, producidas por cepas toxigénicas de hongos filamentosos como metabolitos secundarios después de un tiempo de crecimiento activo y en respuesta a estrés metabólico con diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Son contaminantes naturales de los alimentos, por lo que el hombre siempre ha estado expuesto a ellas en su alimentación. Casi todas las micotoxinas son químicamente estables y generalmente resisten el almacenamiento y la descontaminación de las materias primas, como así también el procesamiento de los alimentos, incluyendo la cocción a altas temperaturas, por lo cual es importante optimizar las condiciones de almacenamiento para evitar su producción ya que no se las puede eliminar por completo.

La presencia de toxinas fúngicas en los alimentos a niveles superiores a los establecidos, representa un riesgo para la seguridad alimentaria, que puede llevar a intoxicaciones agudas, raras en la actualidad, sin embargo, es la toxicidad producida por exposiciones repetidas a bajas concentraciones las que producen los efectos crónicos más preocupantes.

Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de la interrupción de la biosíntesis de ácidos grasos de los hongos filamentosos. Los ácidos grasos son metabolitos primarios, utilizados por los hongos como fuente de energía; las micotoxinas en cambio, son metabolitos secundarios que no son necesarios para el desarrollo de aquellos y suelen formarse al final de la fase exponencial o al principio de la estacionaria del crecimiento fúngico.

Las micotoxinas tienen estructuras químicas muy variadas: desde compuestos simples de bajo peso molecular a muy complejos, pero por lo general tienen un peso molecular medio. Se conocen alrededor de 400 micotoxinas; las halladas más frecuentes como contaminantes de los alimentos son las aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona, patulina, las fumonisinas y los tricotecenos.

Los principales géneros de hongos productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*.

Las ocratoxinas son un grupo de micotoxinas producidos por dos géneros de hongos: *Aspergillus* y *Penicillium*. Constituyen un grupo de compuestos derivados de la isocumarina unida a la L-β-fenilalanina por enlace amida, generalmente vía grupo 7-carboxilo. Existen

diferentes tipos de ocratoxinas: ocratoxina A, ocratoxina B, ocratoxina C, 4-hidroxi-ocratoxina A, 10-hidroxi-ocratoxina A, ocratoxina A hidroquinona, anillo abierto de ocratoxina A y sus derivados no tóxicos, ocratoxina  $\alpha$  y ocratoxina  $\beta$ . La ocratoxina A (OTA) es la más encontrada como contaminante en los alimentos y la más importante en cuanto a la salud humana.

Las especies de hongos productoras de OTA pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Dentro *Aspergillus*, se los puede dividir en dos grupos morfológicos, los de la sección *Circumdati*, de los cuales *A. ochraceus* es la especie productora más importante y los de la sección *Nigri*, donde se destaca *A. carbonarius*. En zonas cálidas tropicales y subtropicales, la contaminación de los productos con OTA, además de la debida a *A. ochraceus*, se suma la debida a *A. niger*, en nueces, porotos, especias, granos de café verde, frutas secas, maní seco, carne procesada, pescado ahumado y salado, en semillas de oleaginosas, piensos combinados, pasas y café. Se ha aislado *Aspergillus niger* var *aculeatus* productor de ocratoxina A en yerba mate compuesta.

En regiones frías y templadas, los hongos productores de OTA son *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum*, estos producen ocratoxina A, a temperaturas de entre 4°C y 31°C. *Penicillium verrucosum* contamina principalmente cereales, mientras que *P. nordicum*, lo hace en carnes y subproductos y quesos.

La OTA se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se elimina con lentitud. Su biodisponibilidad en mamíferos es mayor al 50%. OTA presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, se une en un 99%, principalmente a albúmina, siendo la fracción de toxina libre en plasma menor al 0,2 % en todas las especies estudiadas, incluido el hombre.

La excreción fecal y la urinaria de ocratoxina A son importantes, también se excreta vía biliar y leche materna. Su metabolismo genera derivados hidroxilados y conjugados con glutatión. El principal metabolito es la ocratoxina  $\alpha$  que resulta de la hidrólisis del enlace amídico.

La principal vía de eliminación es la renal, pero debido a la alta unión a la albúmina plasmática la filtración glomerular es despreciable y se excreta luego, en los túbulos renales. La reabsorción tubular es la responsable de la acumulación de la toxina en estas células.

La excreción por leche materna es pequeña, pero adquiere importancia ya que es la única fuente de alimentación del lactante en los primeros meses de vida y continúa siendo importante durante toda la lactancia.

La contribución de cada ruta en la excreción, depende de la vía de administración, la dosis administrada y la unión a proteínas.

Los mecanismos propuestos para explicar la toxicidad de OTA y sus metabolitos son las interacciones específicas en el metabolismo de fenilalanina y emparejamiento con fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica, que produce disrupción de la biosíntesis proteica y glucogénesis, como así también interacciones no específicas por la generación de especies reactivas de oxígeno, que produce estrés oxidativo, inhibición de la cadena respiratoria, formación de aductos de ADN, efectos en la apoptosis y transducción de señal y efecto de combinación con otras micotoxinas, sinérgicas o antagónicas.

La ocratoxina A tiene un potente efecto nefrotóxico y es, además, hepatotóxica, inmunotóxica, mielotóxica, carcinogénica y teratogénica, afecta también al corazón e interfiere con los factores de la coagulación. La toxicidad varía ampliamente según la vía de administración, la especie animal y el sexo.

Los niveles de ocratoxina A en los alimentos son bien conocidos y controlados, pero poco se sabe sobre los niveles en la población, sobre todo pensando que los expertos consideran a las micotoxinas como una de los factores de riesgo crónico alimentarios más importantes.

En el desarrollo de este estudio, tomamos una población acotada y específica con una patología en particular: la insuficiencia renal en tratamiento de diálisis, siendo que ocratoxina A tiene como blanco a la unidad funcional del riñón. Por otro lado, respecto a la determinación de OTA, la técnica de referencia requiere de un equipo de cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC, por sus siglas en inglés) con detector de fluorescencia, que demanda personal especializado y lejos del alcance de laboratorio de mediana complejidad. La técnica de ELISA adaptada, en cambio, ofrece un método sencillo y rápido al alcance de estos laboratorios como una aproximación para el testeo de OTA.

Los objetivos de este estudio fueron, realizar una evaluación de niveles de ocratoxina A en sangre de pacientes dializados de la Ciudad de Posadas, Provincia de Misiones, Argentina, por la técnica de ELISA y conocer los hábitos alimenticios de la población en estudio.

Se realizó un estudio experimental prospectivo de corte transversal. La población en estudio consistió en pacientes dializados de dos servicios de diálisis de la ciudad de Posadas de entre 17 y 84 años de edad.

La colección de las muestras de sangre de ambos centros se realizó intra diálisis y fueron analizadas usando el *kit* comercial de ELISA RIDASCREEN®, competitivo. Cada muestra

fue sometida a un proceso de extracción líquido-líquido, descripta para suero porcino, adaptada a suero humano.

Se procesaron 39 muestras de pacientes de los dos centros de diálisis de la ciudad de Posadas, de ambos sexos: 10 femeninos y 29 masculinos, con edades de entre 17 y 84 años. Todas las muestras de suero analizadas presentaron niveles detectables de OTA, en un intervalo de 0,184 -2,959 ng mL<sup>-1</sup> con una mediana de 1,250 ng mL<sup>-1</sup>. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre los niveles de ocratoxina A y el sexo ni la edad.

En tanto que, el 94,9% de los participantes consignaron que consumía semanalmente productos con harina y almidón, arroz y yerba mate, ya sea como mate, mate cocido o tereré, mientras que la totalidad declaró consumir semanalmente fideos, maíz o choclo. No se observaron diferencias estadísticas significativas entre el tipo de alimento consumido y los niveles de ocratoxina A en sangre.

Se logró evaluar los niveles de ocratoxina A en pacientes dializados de la ciudad de Posadas.

Se pudo conocer los hábitos alimenticios de los pacientes a través de una pequeña encuesta considerando los alimentos más frecuentemente asociados a OTA.

## Abstract.

Mycotoxins are low molecular weight toxic chemical compounds, produced by toxigenic strains of filamentous fungi as secondary metabolites after a time of active growth and in response to metabolic stress with different chemical, biological and toxicological properties. They are natural food contaminants, so mankind has always been exposed to them in their diet. Almost all mycotoxins are chemically stable and generally resist storage and decontamination of raw materials, as well as food processing, including high-temperature cooking, so it is important to optimize storage conditions to avoid their production since they cannot be completely eliminated.

The presence of fungal toxins in foods at levels higher than those established represents a risk to food safety, which can lead to acute poisoning, which is currently rare, however, it is the toxicity produced by repeated exposures to low concentrations that produce the most worrying chronic effects.

Mycotoxins are polyketone compounds resulting from the interruption of fatty acid biosynthesis in filamentous fungi. Fatty acids are primary metabolites, used by fungi as a source of energy; mycotoxins, on the other hand, are secondary metabolites that are not necessary for their development and are usually formed at the end of the exponential phase or at the beginning of the stationary phase of fungal growth.

Mycotoxins have very varied chemical structures: from simple low molecular weight compounds to very complex ones, but they generally have a medium molecular weight. About 400 mycotoxins are known; The most frequent found as food contaminants are aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, patulin, fumonisins and trichothecenes.

The main genera of mycotoxin-producing fungi are *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* and *Alternaria*.

Ochratoxins are a group of mycotoxins produced by two genera of fungi: *Aspergillus* and *Penicillium*. They constitute a group of compounds derived from isocoumarin linked to L- $\beta$ -phenylalanine by an amide bond, generally via a 7-carboxyl group. There are different types of ochratoxins: ochratoxin A, ochratoxin B, ochratoxin C, 4-hydroxy-ochratoxin A, 10-hydroxy-ochratoxin A, ochratoxin A hydroquinone, ring-opened ochratoxin A and its non-toxic derivatives, ochratoxin  $\alpha$  and ochratoxin  $\beta$ . Ochratoxin A (OTA) is the most commonly found contaminant in food and the most important in terms of human health.

OTA-producing fungal species belong to the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Within *Aspergillus*, they can be divided into two morphological groups, those of the *Circumdati* section, of which *A. ochraceus* is the most important producing species, and those of the *Nigri* section, where *A. carbonarius* stands out. In warm tropical and subtropical areas, contamination of products with OTA, in addition to that due to *A. ochraceus*, is added to that due to *A. niger*, in nuts, beans, spices, green coffee beans, dried fruits, dried peanuts, processed meat, smoked and salted fish, oilseeds, combined feed, raisins and coffee. *Aspergillus niger* var *aculeatus* ochratoxin A producer, has been isolated from composite yerba mate.

In cold and temperate regions, the OTA-producing fungi are *Penicillium verrucosum* and *P. nordicum*, these produce ochratoxin A, at temperatures between 4°C and 31°C. *Penicillium verrucosum* mainly contaminates cereals, while *P. nordicum* contaminates meats and by-products and cheeses.

OTA is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract and slowly eliminated. Its bioavailability in mammals is greater than 50%. OTA has a high affinity for plasma proteins, it binds 99%, mainly to albumin, with the fraction of free toxin in plasma being less than 0.2% in all species studied, including man.

Faecal and urinary excretion of ochratoxin A are important; it is also excreted via bile and breast milk. Its metabolism generates hydroxylated derivatives and conjugates with glutathione. The main metabolite is ochratoxin- $\alpha$ , which results from the hydrolysis of the amide bond.

The main route of elimination is the kidney, but due to the high binding to plasma albumin, glomerular filtration is negligible and it is then excreted in the renal tubules. Tubular reabsorption is responsible for the accumulation of the toxin in these cells.

Excretion through breast milk is small, but becomes important since it is the only source of nutrition for the infant in the first months of life and continues to be important throughout lactation.

The contribution of each route in excretion depends on the route of administration, the dose administered and protein binding.

The mechanisms proposed to explain the toxicity of OTA and its metabolites are specific interactions in the metabolism of phenylalanine and coupling with cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase, which produces disruption of protein biosynthesis and



glycogenesis, as well as non-specific interactions due to the generation of reactive species of oxygen, which produces oxidative stress, inhibition of the respiratory chain, DNA adducts formation, effects on apoptosis and signal transduction and combination effect with other mycotoxins, synergistic or antagonistic.

Ochratoxin A has a powerful nephrotoxic effect and is also hepatotoxic, immunotoxic, myelotoxic, carcinogenic and teratogenic, it also affects the heart and interferes with coagulation factors. Toxicity varies widely depending on the route of administration, animal species and sex.

The levels of ochratoxin A in foods are well known and controlled, but few is known about the levels in the population, especially since experts consider mycotoxins as one of the most important chronic dietary risk factors.

In the development of this study, we took a limited and specific population with a particular pathology: renal failure undergoing dialysis treatment, being that the kidney functional unit the ochratoxin A target. On the other hand, regarding the determination of OTA, the reference technique requires high-performance liquid chromatography (HPLC) equipment with a fluorescence detector, which requires specialized personnel and it is not available to medium complexity laboratories. The adapted ELISA technique, on the other hand, offers a simple and rapid method available to these laboratories as an approach for OTA testing.

The objectives of this study were to carry out an evaluation of ochratoxin A levels in the blood of dialyzed patients from Posadas City, Province of Misiones, Argentina, using the ELISA technique and to know the eating habits of the study population.

A prospective cross-sectional experimental study was carried out. The study population consisted of dialysis patients from two dialysis services in Posadas city between 17 and 84 years of age.

Blood samples were collected from both centres during intradialysis and analyzed using the competitive RIDASCREEN® commercial ELISA kit. Each sample was subjected to a liquid-liquid extraction process, described for porcine serum, adapted to human serum.

39 patient samples from the two dialysis centres in Posadas city were processed, of both sexes: 10 female and 29 male, aged between 17 and 84 years. All serum samples analyzed presented detectable levels of OTA, in a range of 0.184 - 2.959 ng mL<sup>-1</sup> with a median of 1,250 ng mL<sup>-1</sup>. No significant statistical differences were observed between ochratoxin A levels and sex or age.

Meanwhile, 94.9% of the participants stated that they consumed products with flour and starch, rice and yerba mate, either as “mate”, “mate cocido” or “tereré”, weekly, while all declared that they consumed noodles, corn weekly. No significant statistical differences were observed between the type of food consumed and blood ochratoxin A levels.

It was possible to evaluate the levels of ochratoxin A in dialyzed patients from the city of Posadas.

The eating habits of the patients were known through a small survey considering those most frequently associated with OTA.

## 1. Introducción.

Las micotoxinas son compuestos químicos tóxicos de bajo peso molecular, producidas por cepas toxigénicas de especies de ciertos géneros de hongos filamentosos como metabolitos secundarios, principalmente después de un tiempo de crecimiento activo y en respuesta a determinadas condiciones de estrés metabólico que tienen diferentes propiedades químicas, biológicas y toxicológicas. Los hongos productores de micotoxinas, crecen en sustratos de origen vegetal, principalmente cereales y forrajes, también en nueces, pistachos y otros frutos secos, carnes ahumadas, especias, vinos, café, frutas, jugo de frutas entre otros, siendo estos alimentos y sus derivados, susceptibles de contaminación con micotoxinas. Éstas son producidas *in situ*, en los cultivos, durante el desarrollo o posteriormente durante la manipulación y almacenamiento inadecuados. Asimismo pueden llegar a la cadena alimentaria de forma indirecta, a través de productos, como la carne, huevos, leche y sus derivados, cuando los animales consumen alimentos contaminados(1), estas características hacen de las micotoxinas contaminantes naturales de los alimentos, la exposición a éstas en los seres humanos ocurre de forma accidental a través de ellos y representan un riesgo para la salud pública.

La ingestión de micotoxinas, enferma o causa la muerte a humanos y animales. El consumo de alimentos contaminados con micotoxinas provoca intoxicaciones conocidas como micotoxicosis, antes reducidas a un segundo plano y que en la actualidad están recibiendo mayor atención(2).

Las micotoxicosis han sido descritas desde la antigüedad, tal es así con los casos de ergotismo a través de la historia, causado por el consumo de alimentos elaborados con cereales contaminados con alcaloides ergóticos, producidos por *Claviceps purpurea*, conocido como cornezuelo del centeno. Los asirios describían ya en el año 600 AC la existencia de una pústula nociva en la espiga del centeno y los persas, 400 a 300 años AC, hablaban de unas hierbas nocivas que causaban aborto o la muerte en el parto(3).

En Europa, los primeros casos documentados datan de la Edad Media, con los “Fuegos de San Antonio”, una epidemia que se caracterizaba por gangrena en las extremidades, manos y brazos, pies y piernas, llegando a producir necrosis y pérdida del miembro en casos graves. Asimismo, los alcaloides ergóticos estuvieron, según algunos historiadores, muy probablemente involucrados en los casos de “brujería” que condujeron a los juicios de Salem en Massachusetts, EE.UU., en 1692; donde las convulsiones que se presentaban

con delirios, perturbación sensorial y agitaciones, producidas por la intoxicación eran interpretados como embrujamiento y posesión. Cuando entrado el siglo XVIII, se sospechó que el pan fabricado con cereales contaminados podría ser causa de intoxicación, disminuyeron sensiblemente los casos, aunque han existido epidemias en ciertas regiones de Europa, en el norte y el este en el siglo XIX y en Rusia (1926).

En India (1968) se contabilizaron 20 muertes y en Etiopía (1978) hubo 47 muertes todas relacionadas con el consumo de centeno contaminado. En Latinoamérica destacan los casos de Uruguay, especialmente en población vegetariana. Algunos investigadores, consideran a las micotoxinas como la causa de la última de las “Diez Plagas de Egipto”(2,3).

A finales del siglo XIX, junto con el conocimiento de la capacidad fermentativa de los hongos, se conocía también la producción de metabolitos tóxicos, tanto sólidos como líquidos y en el siglo XX, una nueva micotoxicosis, conocida luego como “Aleucia Tóxica Alimentaria”, ATA, o aleucemia tóxica alimentaria, se reconoce debida a la producción de toxinas por especies de *Fusarium* y *Stachybotrys* en cereales almacenados durante el invierno o abandonados en los campos, sin cosechar, en Siberia y otros sitios de Rusia; fue particularmente devastadora en el distrito de Orenburgo y produjo la muerte de por lo menos, 100.000 personas entre 1942 y 1948 durante la Segunda Guerra Mundial(2,4,5).

Durante la década del '50 del siglo pasado, se describió una enfermedad renal crónica en zonas rurales de los Balcanes que incluía a Bulgaria, Rumanía, Croacia, Bosnia y Serbia, denominada luego, Nefropatía Endémica de los Balcanes (NEB); que afectaba más frecuentemente a mujeres entre 30 y 50 años. Se sugirió que la ocratoxina A podría ser la causante de esta afección(6).

Pero no es sino hasta entrada la década del '60 que comienza la micotoxicología moderna, con el descubrimiento de las aflatoxinas y sus propiedades cuando mueren miles de aves de corral y otros animales domésticos en Inglaterra por la "enfermedad X de los pavos" y que se atribuyó a la presencia de toxinas producidas por *Aspergillus flavus* en harina de maní importada de Sudamérica y África(2).

En 1965 se consigue obtener de cepas de *Aspergillus ochraceus* aisladas de alimentos elaborados a base de maíz contaminado un nuevo tipo de micotoxina; la ocratoxina A. Cuatro años más tarde se recuperó el mismo compuesto en especies del género *Penicillium*, relacionándola erróneamente con *P. viridicatum*, la posterior revisión de la identificación indicó que se trataba de *P. verrucosum*(2,4,6). Actualmente se considera la posible división de *P. verrucosum* en dos especies ocratoxigénicas: *P. verrucosum* y *P. nordicum* (4).

En 1977, se produjeron diferentes casos de stachybotryotoxicosis en trabajadores de un almacén de heno contaminado con *Stachybotrys chartarum*.

En el presente se conocen más de 400(6,7) micotoxinas diferentes siendo las más relevantes en cuanto a contaminación, exposición e intoxicación alimentaria(6,8): las aflatoxinas, ocratoxina A, patulina, las fumonisinas, zearalenona, los tricotecenos y los alcaloides del ergot.

Debido a su naturaleza química, las micotoxinas se disuelven principalmente en las fases lipídica y acuosa de los alimentos, pudiendo difundir a su interior. Se las encuentran principalmente en cereales, semillas, frutas y alimentos elaborados a base de estas materias primas; relacionándolas con diversas enfermedades en los seres humanos y los animales.

La exposición a micotoxinas produce efectos agudos y crónicos en una gran variedad de animales(2,9,10), ocasionando efectos en el sistema nervioso central, sistemas cardiovascular y pulmonar, tracto digestivo, riñones e hígado; además son agentes cancerígenos e inmunodepresores. La capacidad de algunas micotoxinas de comprometer la respuesta inmune y reducir la resistencia a enfermedades infecciosas es considerada actualmente como uno de sus efectos adversos más importantes(2).

La presencia de micotoxinas en niveles muy superiores a los establecidos, representa un riesgo considerable en la seguridad alimentaria, que puede llevar a intoxicaciones agudas, pero rara vez producen la muerte. En la actualidad son muy pocos los casos de micotoxicosis aguda en humanos, en cambio, son los efectos crónicos los que suscitan mayor riesgo. La toxicidad producida por exposiciones repetidas a bajas concentraciones de éstas son las que producen los efectos más preocupantes. El Comité Mixto Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) - Organización Mundial de la Salud (OMS), considera que el riesgo de intoxicación aguda es mucho menor que el producido por otros compuestos de origen microbiológico, pero se incrementa al considerar los efectos crónicos(2).

Las micotoxinas tienen una alta incidencia en la economía mundial. Según otro estudio de la OMS, el 25% de los cultivos están contaminados con micotoxinas y aproximadamente del 5-10% de la producción mundial se pierde debido a ellas(8,11). Esto tiene un alto impacto en la salud pública y en la economía de los países por la pérdida de los cultivos y la intoxicación a través de los alimentos, de humanos y animales. En los países en vías de desarrollo, los alimentos básicos como el maíz, son susceptibles de ser contaminados con

micotoxinas y los sectores más desprotegidos de la sociedad, se ven afectados de forma significativa por la morbilidad y las muertes prematuras relacionadas con las micotoxinas(2).

### 1.1. Micotoxinas

Las micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de la interrupción de la biosíntesis de ácidos grasos de los hongos filamentosos en determinadas condiciones físicas, químicas y biológicas, estos ácidos grasos son metabolitos primarios(7). Los hongos utilizan para su desarrollo metabolitos primarios que pueden ser ácidos nucleicos, proteínas, carbohidratos y lípidos mayoritariamente. El uso de estos metabolitos primarios se asocia con la fase de crecimiento rápido. Las micotoxinas en cambio, son metabolitos secundarios que no son esenciales para el crecimiento vegetativo en cultivo puro y suelen formarse al final de la fase exponencial o al principio de la estacionaria del crecimiento fúngico(2,5).

Las toxinas fúngicas tienen estructuras químicas muy variadas: desde compuestos simples de bajo peso molecular como la patulina, 154 g/mol; a muy complejos como la fomopsina A, 788 g/mol; pero por lo general son compuestos de peso molecular medio, menor a 300 g/mol(6).

Se conocen entre 200 y 400 micotoxinas(6,7,12); las halladas más frecuentemente como contaminantes de los alimentos y que representan peligro para la salud de los seres humanos y animales son: las aflatoxinas (AF), ocratoxina A (OTA), zearalenona (ZEA), patulina (PAT), las fumonisinas (FBS), los tricotecenos: principalmente deoxinivalenol (DON), toxinas T-2 y HT-2 (4,7,12). En la Tabla 1.1, se consignan las micotoxinas de mayor importancia entre las mencionadas, los sustratos más importantes y los efectos tóxicos más representativos.

Tabla 1.1. Principales micotoxinas, hongos productores, alimentos principales que contaminan y efectos tóxicos más representativos.

MICOTOXINA	HONGO PRODUCTOR	SUSTRATOS PRINCIPALES	EFFECTOS TÓXICOS REPRESENTATIVOS
Aflatoxinas	<i>Aspergillus</i> spp.	Cereales, leche, frutos secos	Altamente cancerígena, produce toxicidad y cáncer de hígado.
Citrinina	<i>Penicillium</i> spp.	Cereales y frutas.	Efecto nefrotóxico, inmunosupresora.
Fumonisin	<i>Fusarium</i> spp. <i>A. niger</i>	Cereales (maíz)	Carcinógena, hepatotóxica.
Ocratoxinas	<i>Aspergillus</i> spp. <i>Penicillium</i> spp.	Cereales, café, legumbres, quesos, carnes ahumadas, frutas	Efecto nefrotóxico, necrosis hepática, efecto inmunosupresor.
Patulina	<i>Penicillium</i> spp.	Cereales, frutas, quesos	Neurotóxica, afecciones pul-monares, lesiones de hígado y riñón, carcinomas, inmunosupresora.
Tricotecenos (T2, NIV, DON)	<i>Fusarium</i> spp.	Cereales.	Afecciones sistema digestivo, circulatorio, nervioso y piel.
Zearalenona	<i>Fusarium</i> spp.	Cereales y subproductos	Afecciones sistema reproductor, estrógeno.

NIV: Nivalenol, DON: Deoxinivalenol, T2: Toxina T-2. Tomado y modificado de González Salgado A. "Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A. 2010. <http://www.ucm.es>.

## 1.2. Clasificación.

La imposibilidad de clasificar a las micotoxinas de forma simple, ha llevado a buscar aspectos más específicos para ello, tales como mecanismos moleculares, activación biológica o estructura química(4,6).

### 1.2.1. Afinidad a organelas celulares.

Una clasificación propuesta por Yoshio Ueno, es por afinidad a organelas celulares, definiendo así, las características toxicológicas y las transformaciones metabólicas(4).

1. Inhibidores de la producción de energía: actúan bloqueando la actividad de la adenosintrifosfatasa (ATPasa), interrumpiendo en consecuencia, la fosforilación oxidativa celular: citreoviridinas; luteoskirina, ergocromos.
2. Inhibidores de síntesis de proteínas: actúan inhibiendo el inicio de la síntesis proteica: tricotecenos verrucarina A, fusarenona-X, nivalenol, o inhibiendo la elongación y terminación de la proteína; tricotecenos: deoxinivalenol, crotocina, verruvarol. Otras micotoxinas inhiben en forma competitiva la actividad de la fenilalanil ARNt sintetasa, Ocratoxina A(13).
3. Modificadores del citoesqueleto: varían las funciones de los microfilamentos y microtúbulos celulares: griseofulvina, citocalasinas, cloropéptido.
4. Micotoxinas estrogénicas: provocan crecimiento del útero y alteración de los niveles circulantes de hormonas: zearalenona.
5. Generadores de temblor (tremorgénicas): actúan sobre el sistema nervioso central provocando temblores generalizados en animales; penitrem A.
6. Micotoxinas cancerígenas: inducen el desarrollo de tumores en hígado y corteza renal: aflatoxinas, esterigmatocistina.

### 1.2.2. Estructura Química.

Desde el punto de vista de la estructura química, las micotoxinas se clasifican en cuatro grupos, resumidos en la Tabla 1.2. Esta es la clasificación más utilizada por analistas ya que facilita el diseño de metodologías de estudio(4,6): inmunoquímicas, como los ensayos inmunoenzimáticos(14), electroquímicas, voltamperometrías de onda cuadrada(15), cromatográficas, como la cromatografía líquida de alto desempeño(16), espectroscopía ultravioleta-visible e infrarroja(15), entre otras.



Tabla 1.2. Relación estructuras químicas, micotoxinas y hongos productores.

Estructura Química	Micotoxina	Hongos productores
Anillo cumarínico	Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i> .
	Esterigmatocistina	<i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. nidulans</i> .
	Ocratoxinas	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> (17), <i>A. tubingensis</i> (17).
Anillo lactónico	Zearalenona	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. viridicatum</i> (17).
	Patulina	<i>Fusarium tricinctum</i> , <i>F. moniliforme</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. gramineatum</i> . <i>Penicillium expansum</i> , <i>P. patulum</i> .
Sesquiterpenos	Tricotecenos	<i>Fusarium</i> spp.
Aminopolihidroxilada	Fumonisin	<i>Trichotecium</i> spp
	Fitotoxinas (alpersinas)	<i>Fusarium moniliforme</i> .
		<i>Alternaria</i> spp.

Tomado y modificado de Juan García, C. Tesis - Análisis Afla y OTA en alimentos y evaluación de ingesta pobl. y Malir F, Ostry V, Pfohl-leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A: 50 Years of Research. Toxins (Basel) [Internet]. 2016;8(191):12–5.

#### 1.2.2.1. Grupo cumarínico:

En este grupo, están las micotoxinas producidas por especies de *Aspergillus*, como las ocratoxinas, las aflatoxinas y la esterigmatocistina.

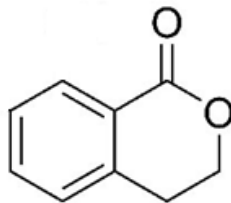


Fig. 1.1. Anillo cumarínico.

#### 1.2.2.2. Grupo lactónico:

En el grupo lactónico se clasifican las micotoxinas producidas por especies de *Penicillium* y de *Aspergillus*, como la patulina y las de *Fusarium*, como la zearalenona,

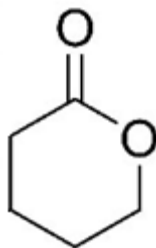


Fig. 1.2. Anillo lactónico:  $\delta$ -lactona.

#### 1.2.2.3. Grupo sesquiterpenoide:

Los sesquiterpenoides en su mayoría poseen una estructura de anillo tetracíclico, que tiene como unidad constitutiva al isopreno. Los tricotecenos son una amplia familia de sesquiterpenoides producidos por distintas especies de *Fusarium*. Entre los más importantes encontramos al deoxinivalenol, nivalenol, las toxinas T-2 y HT-2 y diacetoxiscirpenol (DAS) y que estructuralmente son ésteres de alcoholes sesquiterpenoides(18)(19).

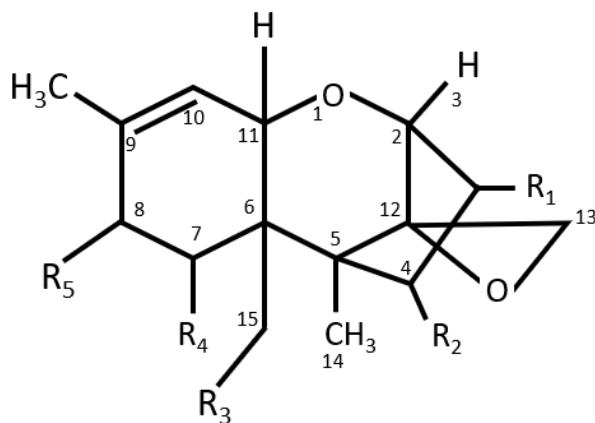


Fig. 1.3. Estructura sesquiterpenoide.

#### 1.2.2.4. Grupo aminopolihidroxilado:

En este grupo, se encuentran micotoxinas producidas por especies de *Fusarium* como las fumonisinas: FB1, FB2 y FB3, por algunas especies de *Alternaria* como las fitotoxinas AAL o alpersina(6,20).

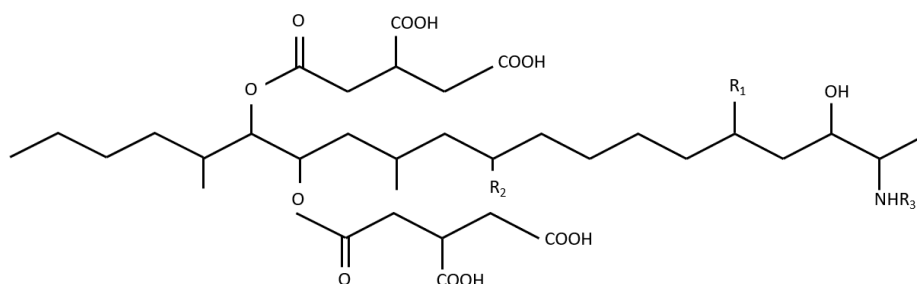


Fig. 1.4. Estructura aminopolihidroxiladas.

### 1.3. Producción de micotoxinas.

El crecimiento fúngico y la producción de micotoxina son consecuencias de interacciones entre el hongo, el sustrato y el ambiente, sea en el campo, el almacenamiento o transporte. La combinación adecuada de estos elementos determinará la colonización del sustrato y el tipo y cantidad de micotoxina producida.

La producción de cualquier micotoxina en particular dependerá no solo de la especie del hongo, sino también de la cepa.

### 1.3.1. Factores condicionantes para la producción.

Son tres los factores fundamentales y condicionantes para la micotoxigenesis: físicos, químicos y biológicos.

#### 1.3.1.1. Factores Físicos.

- Humedad, agua libre y actividad de agua ( $a_w$ ): son de los factores determinantes para la proliferación de los hongos y la producción de micotoxinas, si bien los hongos toxigénicos pueden desarrollar con  $a_w$  a partir de 0,70-0,85, la producción de micotoxinas es prácticamente nula por debajo de  $a_w$  de 0,85(6,7,21).
- Temperatura: el intervalo óptimo para el desarrollo fúngico es de 25-35 °C y la mayoría de los hongos no desarrolla por debajo de los 5 °C, en muchos casos hay una proximidad entre la temperatura mínima necesaria para el desarrollo del hongo y la producción de la micotoxina(21). Zonas de microbiota competidora que forman pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad que aumenta el agua libre y  $a_w$ (6,12,21).
- Integridad física de los granos: los granos intactos dificultan la invasión fúngica, al romperse, aumenta la superficie para el desarrollo y el contacto de los hongos con la parte interna de los granos, que es más sensible que la externa(21).

#### 1.3.1.2. Factores Químicos.

- pH. Los hongos toleran un amplio intervalo de pH, 2,5 - 7,5, además, pueden modificarlo utilizando ácidos grasos excretados por bacterias acidificantes(12,21).
- Composición del sustrato. Los hongos no son exigentes en términos nutricionales y puede aprovechar los elementos existentes en el sustrato donde desarrollan, si bien, es importante la composición del sustrato para la producción de una determinada micotoxina, puede darse el caso de que ocurra una gran proliferación de un hongo micotoxigénico con escasa o nula producción de micotoxina(21).
- Potencial de oxidorreducción,  $O_2/CO_2$ . Los hongos son aerobios y necesitan del oxígeno para su desarrollo, por lo tanto, la composición de los gases del ambiente es importante. La disminución de oxígeno limita el desarrollo fúngico en tanto que la ausencia del mismo, puede producir la muerte.

El  $CO_2$  es otro factor importante para la producción de micotoxinas. Una atmósfera del 2% permite un buen desarrollo fúngico, mientras que composiciones en torno al 10-20%, previenen la formación de algunas toxinas y superiores al 40% la detienen(12,21).

- Nutrientes minerales. Los nutrientes minerales están relacionados con la composición del sustrato y son necesarios tanto para el crecimiento vegetativo del hongo como para la producción de micotoxinas(21).

#### 1.3.1.3. Factores Biológicos.

La presencia de invertebrados que distribuyen las esporas del hongo por el sustrato favoreciendo su diseminación, generan humedad con su metabolismo y rompe los granos facilitando la invasión.

#### 1.4. Hongos productores de micotoxinas.

Los principales géneros de hongos productores de micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Alternaria*.

Las micotoxinas son contaminantes naturales de los alimentos producidas por hongos y estos son ubicuos en la naturaleza, por lo que el hombre siempre ha estado expuesto a ellas en su alimentación. Casi todas las micotoxinas son químicamente estables y generalmente resisten el almacenamiento y la descontaminación de materias primas, como así también la elaboración de alimentos, incluyendo procesos de cocción a altas temperaturas, por lo cual es importante optimizar las condiciones de almacenamiento para evitar su producción(4) ya que no se las puede eliminar por completo de los alimentos.

La presencia de un hongo productor de micotoxinas no supone la presencia de ella; en la producción de micotoxinas participan numerosas variables. De la misma manera, la ausencia del hongo no garantiza que el alimento no esté contaminado, ya que aquél podría haberse eliminado y dejado intacta la micotoxina.

#### 1.4.1. Principales micotoxinas.

Las principales micotoxinas a nivel mundial son: las aflatoxinas, la ocratoxina A, los tricotecenos, zearalenona y las fumonisinas, sin embargo, no hay que descartar otras micotoxinas emergentes como las toxinas de *Alternaria*, beauvericina, citrinina, patulina, toxinas tremorgénicas, entre otras(4).

#### 1.4.1.1. Aflatoxinas.

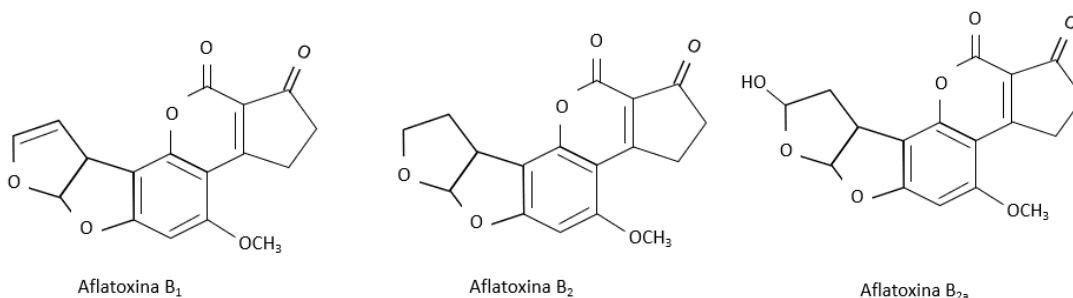
La estructura de las aflatoxinas (AF) se dilucidó en 1962. Se las denomina aflatoxinas B y G (AFB y AFG) por el color de la fluorescencia que emiten bajo la luz ultravioleta (UV); azul y verde en inglés(6). Son producidas por especies pertenecientes al género *Aspergillus* (Tabla 1.2)(4,6,12).

Químicamente son cumarinas sustituidas conteniendo anillos de bifurano y una configuración de tipo lactona. Sus pesos moleculares oscilan entre 312 y 350 g/mol. Purificadas en forma cristalina tienen buena termorresistencia en un rango de pH entre 3 y 10. Sus puntos de fusión son superiores a los 250 °C(6).

Los hongos productores de aflatoxinas están muy extendidos por todo el mundo, abarcando climas tropicales, subtropicales y templados. Los mismos pueden producir aflatoxinas tanto antes como después de la cosecha en numerosos alimentos y piensos, especialmente semillas oleaginosas, nueces comestibles y cereales.

Las condiciones óptimas para el desarrollo de hongos del género *Aspergillus* son, actividad entre 0,87 y 0,99 y temperaturas de 25 a 35°C. Para la producción de toxinas la temperatura óptima oscila entre 20 y 30 °C y actividad de agua entre 0,95 – 0,99(4,12).

Las aflatoxinas más importantes como contaminantes de los alimentos son: las del grupo B, aflatoxinas B1 (AFB1) y B2 (AFB2) y sus metabolitos, que forman el grupo M: aflatoxinas M1 y M2, las del grupo G, aflatoxina G1 (AFG1) y aflatoxina G2 (AFG2)(4,6). Los derivados B2a y G2a se producen cuando se derivatizan las aflatoxinas B2 y G2 para su cuantificación(4). En la figura 1.5 se muestran las estructuras químicas de las distintas aflatoxinas, para el nombre IUPAC ver Anexo 1.



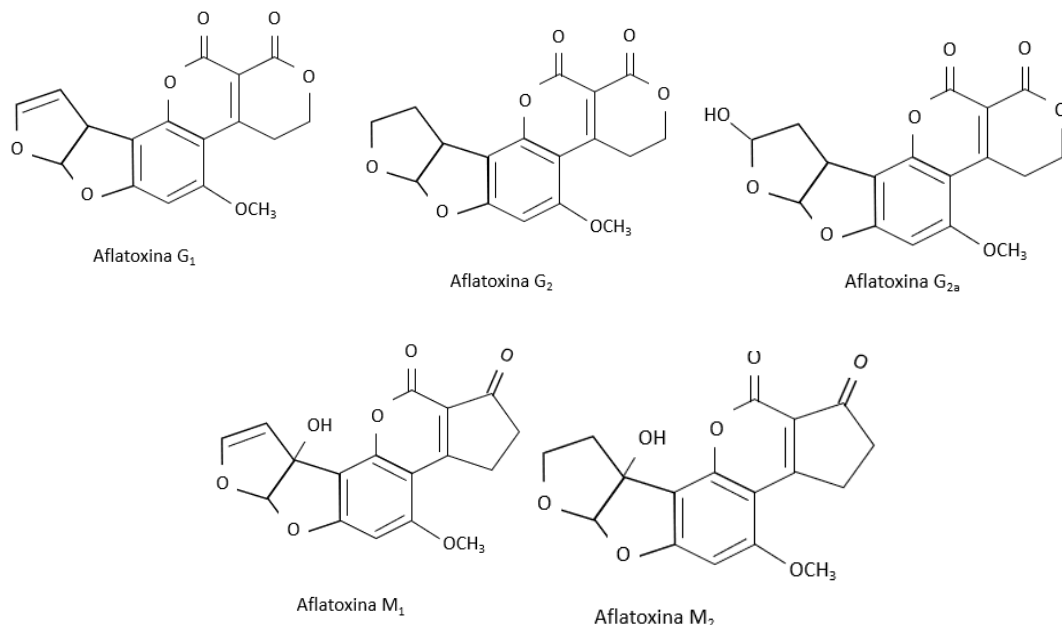


Fig. 1.5: Estructuras químicas de las aflatoxinas

En general, las aflatoxinas presentan baja solubilidad en agua y son solubles en solventes orgánicos moderadamente polares(6). En estado puro son inestables a la luz y al aire. (para características físicas y químicas de las aflatoxinas, ver Anexo 2).

Las aflatoxinas son inmunosupresoras, actúan sobre las membranas celulares, inhibiendo la síntesis de ARN. AFB1 es uno de los metabolitos encontrados en la naturaleza que ha probado mayor potencialidad como agente cancerígeno. Es, además mutagénica y hepatotóxica(4). La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), ha clasificado a la AFB1 carcinógeno de tipo 1, esto es, carcinogénica para el hombre(6).

#### 1.4.1.2. Fumonisin.

Inicialmente caracterizadas y descriptas en 1988, estas toxinas son producidas por algunas especies de *Fusarium*, principalmente *F. verticillioides* (antes *F. moniliforme*), *F. proliferatum* y *F. nygamai*, además, *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*(22).

Las fumonisinas son un grupo que incluyen, de momento, 16 sustancias(22).

La presencia de fumonisinas en granos de maíz está asociada con casos de cáncer esofágico en Sudáfrica, China e Italia. Son causante de leucoencefalomalacia en equinos (6,22) y conejos, edema pulmonar e hidrotórax en cerdos. Son hepatotóxicas, carcinogénicas e inductoras de apoptosis en hígado de rata. También se han recuperado fumonisinas en maíz comercializado en un supermercado de Charleston, EE. UU., la ciudad con la más alta incidencia de cáncer esofágico en la población afroamericana de ese país(22). Los órganos afectados son: cerebro, pulmón, hígado, riñón y corazón. Sin embargo, actualmente no hay una evidencia directa para afirmar que las fumonisinas causen problemas de salud en los humanos(1) y la IARC concluye que los estudios y datos cuantitativos disponibles no son significativamente conclusivos y son insuficientes para evidenciar que las fumonisinas ingeridas por vía oral sean carcinogénicas para los humanos y así pues son consideradas como “posibles carcinogénicas”(1).

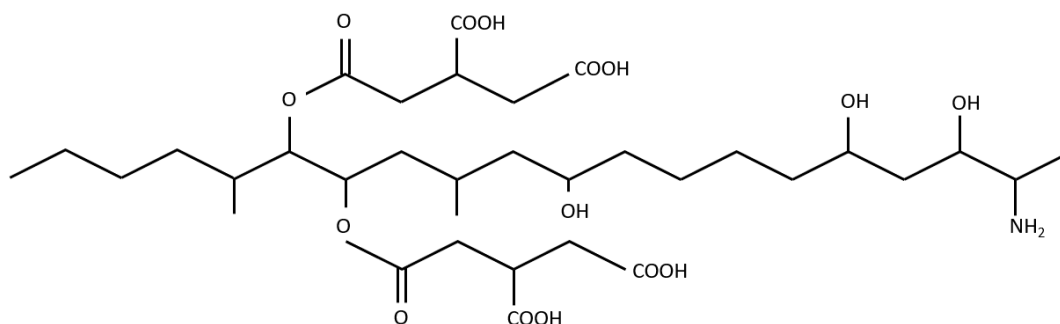


Fig.1.6. Estructura de fumonisina B1.

A diferencia de otras micotoxinas, las fumonisinas son hidrosoluble, lo que dificulta su estudio (22). La estructura es una cadena alifática aminopolihidroxilada con etil éter. Las fumonisinas de la serie B son ésteres de 2-amino-12,16-dimetil-14,15-dihidroxiecosano y propano-1, 2, 3-ácido tricarboxílico(3). La B1 es ampliamente la más estudiada, las fumonisinas B2 y B3 son co-contaminantes comunes de cereales(18).

La actividad carcinogénica de fumonisinas no está relacionada con interacciones con el ADN sino con la biosíntesis de esfingolípidos, por su similitud con el aminoácido esfingosina, lo que acarrea problemas con la actividad celular que involucran a la membrana(22).

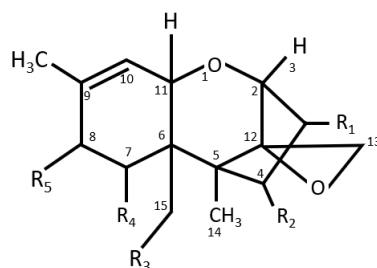
Los principales síndromes que pueden provocar son: neurotóxicos (leucoencefalomelacia), nefrotóxicos, hepatotóxicos, edema pulmonar y cerebral, lesiones cardíacas y cáncer de esófago.



### 1.4.1.3. Tricotecenos.

Los tricotecenos fueron los causantes de la gran mortandad en la entonces Unión Soviética durante la segunda guerra mundial, cuando la población forzada por el hambre, comenzó a elaborar el pan con cereales abandonados sin cosechar en los campos que estaban contaminados con *Fusarium*. La enfermedad causada por intoxicación con tricotecenos se conoce como aleucia tóxica alimentaria, ATA, cuyo cuadro clínico incluye irritación del tracto intestinal, vómitos, diarreas y en los casos más graves, leucopenia, trombocitopenia y anemia, llevando a una aplasia medular a menudo de curso mortal(4,8,11).

Los tricotecenos pertenecen a un amplio grupo de sesquiterpenos cíclicos, compuestos por un núcleo central de anillos de ciclohexeno y tetrahidropirano fusionados. Además, una parte de un ciclopentilo también está fusionada al anillo de tetrahidropirano (figura 1.7). Todos los tricotecenos poseen un epóxido, que es el responsable de su toxicidad y se clasifican en tricotecenos del tipo A, B, C y D en función de pequeñas diferencias estructurales. Los más relevantes son los del tipo A que incluyen: toxina T-2, toxina HT-2 y diacetoxiscirpenol (DAS) y los del tipo B: deoxinivalenol (DON), 3-acetil-deoxinivalenol y 15-acetil-deoxinivalenol, nivalenol (NIV) y fusarenona X (Fus X) (Tabla 1.3).



**Fig. 1.7.** Estructura general de los tricotecenos.

**Tabla 1.3. Principales tricotecenos .**

Micotoxina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>Deoxinivalenol</b>	OH	H	OH	OH	=O
<b>Nivalenol</b>	OH	OH	OH	OH	=O
<b>Toxina T-2</b>	OH	OAc	OAc	H	O-Isoval
<b>Toxina HT-2</b>	OH	OAc	OH	H	O-Isoval

**Referencias.** Ac: acetil; Isoval: isovaleril.

Este grupo de micotoxinas son producidas por varios géneros de hongos filamentosos, pero los más importantes respecto a la seguridad alimentaria pertenecen a especies del género *Fusarium*(11). Se encuentran en diversos tipos de cereales como trigo, centeno, avena y maíz(11) (Tabla 1.4).

**Tabla 1.4.** Especies de *Fusarium* productoras de tricoteceno.

Especie	Tricotecenos producidos más importante.
<i>F. graminearum</i>	DON, 3-A-DON, 15-A-DON, NIV.
<i>F. culmorum</i>	DON, 3-A-DON, NIV, toxina T-2. Toxina HT-2.
<i>F. crockwellense</i>	NIV, FUS X.
<i>F. avenaceum</i>	FUS X.
<i>F. poae</i>	NIV, FUS X, toxina T-2, toxina HT-2.
<i>F. triticum</i>	Toxina T-2.
<i>F. proliferatum</i>	FUS X.
<i>F. equiseti</i>	Toxina T-2, Toxina HT-2, US X.

Tomado y modificado de Munitz M (Facultad de CE y NU de BA. Arándanos: micoflora contaminante, micotoxinas, residuos de fungicidas y cinéticas de degradación. Bibl Cent Dr Luis Federico Leloir [Internet]. 2013;355.

Estos compuestos son extremadamente tóxicos para las células eucariotas. A nivel celular, inhiben la síntesis de ADN, ARN y proteínas, porque se unen a los ribosomas, desestabilizan el funcionamiento mitocondrial, la integridad de la membrana celular y afectan a la división celular. Por otro lado, tienen efectos inmunosupresores e inmunoestimulantes, lo que afecta la resistencia a infecciones y neoplasias o favorecen el

desarrollo de enfermedades autoinmunes(4,11). Inducen la apoptosis, particularmente en tejidos linfáticos y hematopoyéticos.

#### 1.4.1.4. Zearalenona.

La zearalenona (ZEA) es una micotoxina producida por hongos filamentosos del género *Fusarium*. Se la puede encontrar como contaminante de varios tipos de granos principalmente en maíz(4,11). La especie indicada como la más importante en cuanto a su producción es *F. graminearum*, otras especies productoras son: *F. culmorum* y *F. oxysporum* (*F. redolens*).

La ZEA químicamente es una 6-[10-hidróxi-6-oxo-trans-1-undecenil]-β-ácido resorcíclico lactona (figura 1.8). Tiene un peso molecular de 318,36 g/mol, es cristalina de color blanco, con punto de fusión de 165 °C. Es soluble en álcali acuoso y en solventes orgánicos, insoluble en agua, además es termoestable(4). La biotransformación de zearalenona, produce: zearalanona, α-zearalanol, β-zearalonol, α-zearalenol y β-zearalenol; donde α-zearalenol es reconocido como el metabolito más abundante y más tóxico (estrogénico) que zearalenona. (4,23).

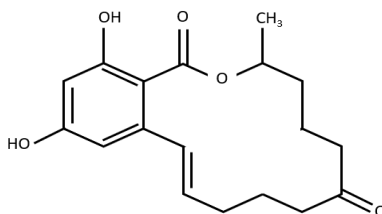


Fig. 1.8. Estructura química de Zearalenona.

La zearalenona tiene una baja toxicidad aguda, pero interactúa fuertemente con los receptores estrogénicos, interfiriendo en aparato reproductor. Actúa por unión competitiva con los receptores de estradiol, 17-β-estradiol, adoptando configuraciones semejantes, estimulando la síntesis de ADN, ARN y proteínas en el útero y las glándulas mamarias. Inhibe la maduración folicular y la ovulación por reducción de la concentración de la hormona folículoestimulante.

Entre los efectos más importantes de las zearalenonas están: la disminución de la fertilidad, la pubertad precoz, alteración del peso de las glándulas tiroidea, adrenal y

pituitaria, cambios en los niveles de progesterona y estradiol en suero, fibrosis del útero, cáncer de mama, carcinoma de endometrio e hiperplasia de útero, en cerdas(7). Se sospecha que pueda provocar lesiones hepáticas que deriven en cáncer de hígado. No está del todo claro si las zearalenonas son carcinogénica, por ello la IARC las cataloga en el grupo 3: no puede ser clasificada respecto a su carcinogenicidad(12).

#### 1.4.2. Toxicidad de las micotoxinas.

Elevados niveles de micotoxinas en la dieta pueden causar efectos adversos en el hombre y los animales. La acción de estas toxinas afecta a muchos órganos, aparatos y sistemas, principalmente hígado, riñón, sistema nervioso, endócrino e inmunitario y pueden ser muy tóxicas. Los síntomas que se presentan son muy variados(2,6).

La actividad toxicológica depende de varios elementos: naturaleza de la micotoxina, dosis de la misma, tiempo de exposición, puerta de entrada y susceptibilidad del huésped, que se ve afectada por factores genéticos y fisiológicos: edad, hormonas, estado nutricional(24).

Los efectos más comunes de la intoxicación aguda por micotoxinas son el deterioro de la actividad renal o hepática(12), que en casos extremos puede llevar a la muerte(18). Además, algunas interfieren en la biosíntesis proteica, causando síntomas que van desde sensibilidad cutánea o necrosis hasta inmunodeficiencia severa. Otras son neurotóxicas pudiendo causar temblores, pero solo a altas dosis producen daño cerebral(4,9).

Los efectos por exposición crónica a micotoxinas también son muy variados. El efecto primario de muchas es la inducción de cáncer, especialmente, hepático. Algunas afectan el ADN y por lo tanto inducen mutagénesis y/o teratogénesis.

Además de la toxicidad, para que una micotoxina sea de importancia para la salud humana hay ciertas condiciones que deben cumplirse: primero, el hongo debe estar ampliamente distribuido; segundo, debe desarrollar en los alimentos y tercero, las condiciones de producción de la toxina fúngica no deben ser muy exigentes.

## 1.5. Ocratoxina A.

### 1.5.1. Generalidades de las ocratoxinas y ocratoxina A.

Las ocratoxinas son un grupo de metabolitos secundarios producidos por dos géneros de hongos: *Aspergillus* y *Penicillium*. Constituyen un grupo de compuestos derivados de la isocumarina, unida a la L-β-fenilalanina por enlace amida, generalmente vía grupo 7-carboxilo (figura 1.9). Existen diferentes tipos de ocratoxinas: ocratoxina A (OTA), ocratoxina B (OTB), ocratoxina C (OTC)(2,25), 4-hidroxi-ocratoxina A (4-OH-OTA), 10-hidroxi-ocratoxina A (10-OH-OTA), ocratoxina A hidroquinona (OTA-HQ)(26), anillo abierto de ocratoxina A (OP-OTA)(3,26) y sus derivados no tóxicos, ocratoxina α (OTα) y ocratoxina β (OTβ)(2,3,6,25). (Tabla 1.5).

La ocratoxina A (Figura 1.10) es la más comúnmente encontrada en los alimentos y la más importante en cuanto a la salud humana, las ocratoxinas B y C también son contaminantes naturales de los alimentos(27). Los metabolitos OTA-HQ y OP-OTA son más tóxicos que OTA(26,28) y OTα y OTβ, son productos de hidrólisis ácida que ocurren en reacciones metabólicas y aparecen en fluidos biológicos como sangre, orina y leche; éstas han perdido el residuo fenilalanina y, por tanto, la actividad tóxica. Los derivados metil éster de OTA y metil y etil éster de OTB, son productos sintéticos con fines analíticos. (Tabla 1.5).

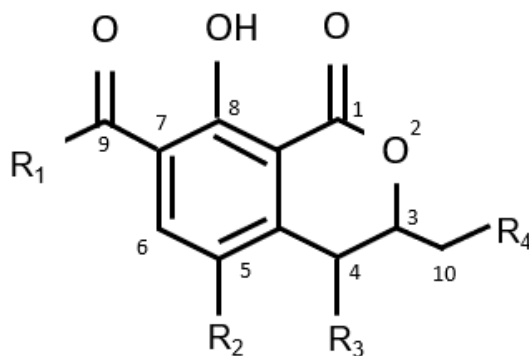


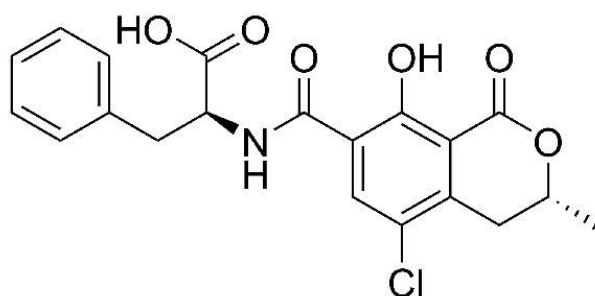
Fig. 1.9. Estructura química general de las ocratoxinas.

Tabla 1.5.

Ocratoxina	R1	R2	R3	R4
<b>OTA</b>	Fenilalanina	Cl	H	H
<b>OTB</b>	Fenilalanina	H	H	H
<b>OTC</b>	Fenilalanina-etil éster	Cl	H	H
<b>OTA-MeE</b>	Fenilalanina-metil éster	Cl	H	H
<b>OTB-MeE</b>	Fenilalanina-metil éster	H	H	H
<b>OTB-EtE</b>	Fenilalanina-etil éster	H	H	H
<b>4-OH-OTA</b>	Fenilalanina	Cl	OH	H
<b>10-OH-OTA</b>	Fenilalanina	Cl	H	OH
<b>OTA-HQ</b>	Fenilalanina	OH	H	H
<b>OP-OTA</b>	Fenilalanina	Cl	H	-
<b>OT<math>\alpha</math></b>	OH	Cl	H	H
<b>OT<math>\beta</math></b>	OH	H	H	H

Adaptado de Juan García C. Análisis de aflatoxina y ocratoxina A en alimentos y evaluación de la ingesta poblacional. Vasa. 2008.

La ocratoxina A es un ácido débil, con valores de  $pK_a$  de 4,2-4,4 para el residuo carboxilo de la fenilalanina y 7,0, 7,3, para el grupo hidroxifenólico del residuo isocumarina.



**Fig. 1.10.** Estructura de ocratoxina A.

### 1.5.2. Hongos productores de ocratoxina A.

Las especies de hongos productoras de OTA pertenecen a los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Dentro *Aspergillus*, a los ocratoxigénicos se los pueden dividir en dos grupos morfológicos distintos: el primero incluye especies productoras de conidios marrón-dorado de la Sección *Circumdati*, relacionadas con *A. ochraceus*: *A. wertheimii* y *A. steynii* (Frisvad y col. 2004) (3,29,30); el segundo corresponden a los de la Sección *Nigri* (Samson y col. 2004), que incluyen especies productoras de conidios negros, siendo *A. carbonarius* la más importante (prácticamente la totalidad de las cepas de esta especie producen ocratoxina A) y *Aspergillus sclerotiorum*, *A. lacticoffeatus* y *A. niger* var. *niger*(3,30–32).

Otras especies de *Aspergillus* productoras de OTA, todas de la sección *Circumdati* son: *A. alliaceus*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii*, *A. sclerotiorum* y *A. sulphureus*(20,31,33)

En relación a los climas, en zonas cálidas tropicales y subtropicales, la contaminación de los productos con OTA, además de la debida a *A. ochraceus*, se suma la debida a *A. niger*, en nueces, porotos, especias, granos de café verde, frutas secas, maní seco, carne procesada, pescado ahumado y salado, en semillas de oleaginosas, piensos combinados, pasas y café(31). Se ha aislado *Aspergillus niger* var *aculeatus* productor de ocratoxina A en yerba mate compuesta(32).

En regiones frías y templadas, los hongos productores de OTA son *Penicillium verrucosum* y *P. nordicum*, estos producen ocratoxina A, a temperaturas de entre 4°C y 31°C. *P. verrucosum* contamina principalmente cereales, mientras que *P. nordicum*, lo hace en carnes y subproductos y quesos(3,31,34).

La producción de OTA, depende de varios factores: temperatura, actividad de agua ( $a_w$ ), composición del sustrato, lo que afecta la fisiología de los hongos productores de ésta (2).

### 1.5.3. Toxicología de ocratoxina A

#### 1.5.3.1. Toxicocinética.

En todas las especies animales estudiadas: diferentes “linajes” de ratas de laboratorio como Sprague-Dawley, roedores, cerdos, pájaros, perros y pequeños rumiantes (2,35,36), la OTA se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y se elimina lentamente. Su biodisponibilidad en mamíferos es mayor al 50%. OTA presenta una alta afinidad por las proteínas plasmáticas, se une a ellas en un 99%, siendo la fracción de toxina libre en plasma

menor al 0,2 % en todas las especies estudiadas, incluido el hombre. Circula principalmente unida a albúmina y se observa variación en el tiempo de vida media en sangre en diferentes especies que dependen de la afinidad y el grado de unión a proteínas. Se ha demostrado que además de albúmina, OTA se une específicamente y con mayor afinidad a otras dos proteínas plasmáticas de peso molecular de 20.000 Da, éstas, por su tamaño, pueden atravesar la membrana glomerular, lo que podría explicar en parte, el daño renal.

La ocratoxina A se excreta de por vía biliar y es reabsorbida en el intestino por las venas mesentéricas, entrando así en la circulación entero-hepática, mecanismo que favorece su redistribución. En el riñón, se reabsorbe en los túbulos distal y proximal, lo que aumenta aún más la redistribución. Se acumula en sangre, hígado y riñón. Estos dos últimos juegan un papel importante en la biotransformación de OTA.

El metabolismo de ocratoxina A genera derivados hidroxilados (4-OH-OTA, 10-OH-OTA) y conjugados con glutatión. El principal metabolito es ocratoxina  $\alpha$ , que resulta de la hidrólisis del enlace amídico, reacción catalizada por carboxipeptidasas y otras enzimas bacterianas, también se excreta en forma inalterada, como OTA y como 4(R)-OTA(37).

Si bien en los seres humanos se desconocen los parámetros toxicodinámicos, se ha demostrado *in vitro* una alta unión a proteínas plasmáticas, por lo que se puede inferir que OTA tendrá una vida media elevada(34).

La principal vía de excreción parece ser la renal, pero debido a la alta unión a albúmina plasmática, la filtración glomerular es despreciable y se excreta luego en los túbulos renales. La reabsorción tubular es la responsable de la acumulación de esta toxina en las células del túbulo proximal(36).

La excreción biliar, como se mencionó anteriormente, es otra vía de eliminación; la eliminación por leche materna, aunque es pequeña, adquiere importancia ya que es la única fuente de alimentación del lactante en los primeros meses de vida y continúa siendo importante durante toda la lactancia(34).

La contribución de cada ruta en la excreción, depende de la vía de administración, la dosis administrada y la unión a proteínas.



### 1.5.3.2. Toxicodinamia.

La toxicodinamia es el estudio de las interacciones de una sustancia con sus blancos en los sistemas biológicos y los efectos bioquímicos posteriores que se producen, son esas interacciones uno de los factores determinantes en la toxicidad de OTA. Numerosos mecanismos se han propuesto para explicar la toxicidad de ocratoxina A y sus metabolitos que están relacionados a interacciones altamente específicas, basadas en uniones a sitios muy concretos de la molécula blanco y a las interacciones no específicas, basadas en la reactividad química de ocratoxina A y sus metabolitos.(31).

- Interacciones específicas.

Interacciones con el metabolismo de fenilalanina. Ocratoxina A es un análogo de este aminoácido por su residuo de fenilalanina, interfiere así, en la biosíntesis proteica, pero también lo hace en la de ADN y ARN a través de la inhibición de la fenilalanina-ARNt sintetasa y la de fenilalanina hidroxilasa. Además, de forma indirecta, interrumpe la síntesis proteica, lo que afecta la actividad de varias enzimas celulares, entre ellas la de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa citosólica, enzima clave en glucogénesis, por lo tanto, afectará el metabolismo de los hidratos de carbono.

- Interacciones no específicas.

Generación de especies reactivas de oxígeno. OTA induce la formación de potentes oxidantes: anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales libres de oxhidrilo, lo que desencadena la peroxidación lipídica dependiente de NADPH y ascorbato, esto produce disrupción del metabolismo del calcio(31). El estrés oxidativo producido por OTA en ratas, induce glucosuria transitoria luego de 7 días de administración por el daño del túbulo proximal y afección en la expresión del transportador de glucosa(36).

Inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial. Se ha demostrado que OTA altera la morfología mitocondrial e inhibe la respiración por inhibición competitiva con proteínas transportadoras de fosfato en el interior de la membrana mitocondrial y/o por efecto directo sobre la cadena de transporte de electrones. Este mecanismo no está del todo claro, ya que se ha observado inhibición de la respiración mitocondrial por OT $\alpha$  que no es tóxica(31).

Formación de aductos de ADN. Los aductos ocurren cuando una sustancia, en este caso la ocratoxina A, tiene capacidad de unirse covalentemente a las bases nitrogenadas, del ADN, se dice que es genotóxica; si además, se demuestra que esa interacción es estable y hereditaria, entonces se produce una mutación, es decir, la sustancia es mutagénica(38).

Se ha demostrado la formación de aductos con el ADN dosis -tiempo dependiente en hígado y bazo de animales de experimentación, que se eliminan luego de 5 días, pero persisten hasta 16 en el riñón. Esta genotoxicidad de OTA se sabe que es dependiente de activación metabólica pero la estructura química de esos metabolitos no se ha dilucidado y no está claro si son aductos de tipo covalentes(31,38).

Efectos en la apoptosis y transducción de señal. Se ha reportado que OTA induce apoptosis *in vivo* en órganos de ratas: túbulos renales, embriones e hígado e *in vitro*, en varias líneas de células humanas: linfocitos, células HL-60 y HeLa, entre otras. La ocurrencia de apoptosis en estas líneas celulares, luego de una exposición a OTA es considerada como parte de un mecanismo regulatorio para reestablecer el número de células originales o el tamaño del órgano luego de la hiperplasia inicial. Las concentraciones nanomolares en las que OTA está presente en los alimentos son suficientes para facilitar apoptosis por causa de la reducción de la síntesis proteica, incremento en la actividad de caspasa-3, fragmentación de ADN y condensación de la cromatina. Además, se ha demostrado que OTA induce la transcripción de varios genes involucrados en el daño al ADN(31).

Efecto de combinación con micotoxinas. Cuando se estudian a las micotoxinas, generalmente se las estudia *in vitro* individualmente, pero habitualmente se encuentran en los alimentos combinadas con otras.

Se observaron diferentes tipos de interacciones entre OTA y OTB, sinérgicas, sobre la actividad de la fenilalanina-ARNt sintetasa, en las células del hepatoma y la respiración mitocondrial. Interacciones antagónicas se observaron en lo que respecta a la inmunotoxicidad y la nefrotoxicidad. Observaciones que adquieren importancia sobre todo por la presencia conjunta de estas micotoxinas en los alimentos debido a su biosíntesis común(31).

Las interacciones sinérgicas ocurren entre OTA y citrinina (CIT), una toxina nefrotóxica y que concurre con aquella en los cultivos de cereales. Se encontró que CIT incrementa los efectos carcinogénicos de OTA(31).

El ácido penicílico es otra toxina nefrotóxica que puede encontrarse con OTA en los cultivos de cereales. OTA junto a ácido penicílico actúan sinérgicamente aumentando la mortalidad en diferentes animales de experimentación como así también lesiones renales en otros. Esta acción está relacionada con la inhibición de la carboxipeptidasa A del ácido

penicílico, acción que, a su vez aumenta la toxicidad de OTA retrasando la hidrólisis a OT $\alpha$ (31).

#### 1.5.4. Micotoxicosis por ocratoxina A.

##### 1.5.4.1. Toxicidad aguda.

Los mecanismos por los cuales OTA induce nefrotoxicidad incluyen: inhibición de la síntesis proteica, daño al ADN e inducción de apoptosis celular. Esta micotoxina es reconocida como un potente nefrotóxico debido a su acumulación en las células epiteliales del túbulo proximal e iniciando el daño celular a través del estrés oxidativo, daño al ADN, apoptosis y respuesta inflamatoria(39).

La ocratoxina A es tóxica en todos los modelos animales testeados, excepto en rumiantes adultos, debido a la hidrólisis de la biota habitual del rumen(26,33,34). Si bien su blanco es el riñón, también afecta al hígado, corazón, interfiere con los factores de la coagulación, provoca lesiones intestinales, aberraciones en el tejido linfóide y mielotoxicidad(33).

La toxicidad varía ampliamente según la vía de administración, la especie animal y el sexo. La dosis letal 50 (DL50) oscila en un rango de 20 y 46–58 mg/kg de peso corporal en cerdo, gatos, conejos y perros. Los síntomas incluyen hemorragias multifocales en todos los órganos mayores: hígado, bazo, corazón y riñones, nefrosis, necrosis hepática y enteritis coincidente con atrofia de las vellosidades intestinales. La reabsorción en los túbulos renales puede ser la responsable de la nefrotoxicidad(33).

##### 1.5.4.2. Carcinogénesis.

Ocratoxina A está clasificada dentro del grupo 2B de la IARC, a altas dosis incrementa la producción de adenomas y carcinomas en las células del tubulares del riñón, como así también la incidencia de fibroadenomas en las glándulas mamarias de ratas F344, tratadas oralmente con OTA por 2 años con dosis de 21, 70 y 210  $\mu$ g/kg. En el mismo estudio, OTA causó cambios no neoplásicos que incluyeron: hiperplasia de células tubulares, alteraciones citoplasmáticas, cariomegalia y degeneración del epitelio del túbulo renal. Utilizando el mismo modelo animal de ratas F344, se observó que ocratoxina A es menos carcinogénica cuando se consume con los alimentos que cuando se la administra por sonda

vía oral. Se encontró, además, proliferación celular en la médula y la capa externa de la médula externa de los riñones, dosis-tiempo dependiente, lo que sugiere mecanismos epigenéticos en la toxicidad de OTA, ya que se reconocen proliferación celular y formación de tumores en las mismas regiones localizadas del órgano. Aduetos con ADN fueron encontrados en riñones de animales de experimentación como así también, en riñones humanos en Francia, Bélgica, Croacia, Bulgaria y Serbia(33).

## 2. Justificación o problemática de tema.

Las micotoxinas en general y la ocratoxina A en particular están poco estudiadas en humanos en la Argentina, si bien su presencia en los alimentos está bien controlada, no sabemos los niveles que presenta la población general, atento a que expertos en la evaluación del riesgo de contaminantes en los alimentos, consideraran a las micotoxinas como uno de los factores de riesgo alimentario crónico más importantes, por encima de los contaminantes sintéticos, plantas tóxicas, aditivos alimentarios o residuos de plaguicidas.

La exposición a esta toxina fúngica tiene que ver con la calidad y la seguridad alimentarias, es así que los sectores más desprotegidos de la sociedad son los que tienen menor acceso a alimentos de calidad, esto, sumado a que en la provincia de Misiones y en la región del NEA, muchas familias producen sus propios alimentos, tanto cereales, principalmente maíz, porotos, carne de pollo y cerdo, productos lácteos, mandioca, batatas, maní, entre otras, que quedan fuera de los controles sanitarios, siendo un sector potencial de alta exposición a las toxinas fúngicas.

En el caso de ocratoxina A, tomamos una población acotada y específica que presenta una patología base, insuficiencia renal, en actual tratamiento de diálisis, siendo que OTA tiene como blanco a la unidad funcional del riñón; representa una posible causa de esa insuficiencia renal.

Por otro lado, respecto a la determinación de OTA, la técnica estándar requiere de un equipo de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés) con detector de fluorescencia, que demanda personal especializado lejos de las posibilidades de laboratorio de mediana complejidad. La técnica de ELISA adaptada, en cambio, ofrece un método sencillo y rápido al alcance de estos laboratorios como una aproximación para el testeo de OTA.

### 3. Hipótesis.

En los pacientes dializados de la ciudad de Posadas se encuentran altos niveles de Ocratoxina A.

#### 4. Objetivos.

Realizar una evaluación de niveles de ocratoxina A en pacientes dializados de la ciudad de Posadas, Provincia de Misiones mediante un teste de ELISA adaptado.

Conocer los hábitos alimenticios de la población en estudio.

## 5. Materiales y métodos.

### 5.1. Tipo de estudio.

Prospectivo de corte transversal.

### 5.2. Población en estudio.

Pacientes dializados de dos servicios de diálisis de la Ciudad de Posadas, categorizados como Centro de diálisis P (CD-P) y Centro de diálisis F (CD-F), donde concurren pacientes con obra social, de edades de entre 17 y 84 años. Todos los y las pacientes firmaron un consentimiento informado. (Anexo 3).

### 5.3. Muestreo.

Se recogieron muestras de sangre de pacientes en diálisis de los centros CD-P y CD-F durante el mes de junio de 2014. De CD-P, se tomaron 19 muestras y de CP-F, 20. El número total de muestras del estudio fue de 39, 29 masculinos y 10 femeninos.

La colección de la sangre se realizó intra diálisis y se depositaron en tubos Vacutainers® para suero, protegiéndolas de la luz. Posteriormente, fueron transportadas al laboratorio, de Micología, “*Dra. Martha Gladis Medvedeff*”, de la Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, FCEQyN, de la Universidad Nacional de Misiones, UNaM, donde se centrifugaron a 2.500 r.p.m., a temperatura ambiente. Los sueros se pasaron a tubos de fondo cónico de 3 mL de capacidad, con tapa a presión y se los congeló a -18°C, protegidos de la luz hasta su procesamiento.

### 5.4. Análisis de Ocratoxina A

Las muestras fueron analizadas usando el *kit* comercial de ELISA RIDASCREEN®, competitivo, en dos semanas consecutivas de julio de 2014, primero las del centro CD-P y en la semana siguiente, las del centro CD-F. Cada muestra de suero fue sometida a un proceso de extracción líquido-líquido, descripta por el fabricante para suero porcino, adaptada a suero humano.



Con los sueros estándares, provistos por el fabricante, se construyeron las curvas de calibración para calcular las concentraciones, midiendo la absorbancia de estándares y muestras según se procesaban las muestras obtenidas en cada centro.

Tanto las muestras como los estándares fueron analizadas por duplicado.

#### 5.4.1. Método de cuantificación de ocratoxina A.

Se utilizó RIDASCREEN® *Ochratoxin A 30/15*, enzimoimmunoensayo competitivo para el análisis cuantitativo de ocratoxina A en cereales, alimentos, cerveza y suero porcino.

Todos los reactivos requeridos para el ensayo, incluyendo los estándares, son provistos por el fabricante. En el ANEXO 5, se muestra el certificado de calidad de la prueba de ELISA RIDASCREEN® *Ochratoxin A 30/15*.

Las pruebas del *kit* son suficientes para 96 determinaciones, incluidos los estándares.

#### 5.4.2. Preparación de las muestras. Extracción.

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a la técnica descrita por el fabricante, con la mitad de los volúmenes: técnica reducida.

Se diluyeron 2 mL de cada muestra en 1,25 mL de HCl 1N y 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (grado puro: 99,5%) en un tubo cónico con tapa a rosca, de 15 mL de capacidad. Se agitaron 5 minutos y se centrifugaron a 3.500 g, 15 minutos.

Se descartó la capa acuosa sobrenadante.

Se aspiró con una pipeta *Pasteur* de 3 mL de capacidad, de material plástico, descartable, de tal manera de separar la torta, de la muestra y se recogió el CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> en un nuevo tubo. 1 mL de la capa de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se transfirieron a un tubo cónico.

La capa de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, fue sometida a una nueva extracción con 2 mL del tampón NaCO<sub>3</sub>H 0,13 M, agitando 5 min e inmediatamente centrifugada: 15 min / 3.500 g.

Se recogió la capa sobrenadante de NaCO<sub>3</sub>H.

Se repitieron la extracción y centrifugación.

Se combinaron ambas fases de NaCO<sub>3</sub>H y se diluyó con 0,75 mL de HCl 1N y 2 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Se mezcló en agitador durante 10 min. Y posteriormente se centrifugó 15 min / 3.500 g.

Se removió la capa sobrenadante acuosa y se preservó completamente la capa de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  que se evaporó hasta sequedad a  $60^\circ\text{C}$ .

Se redisolvió el residuo en 1 mL del tampón  $\text{NaCO}_3\text{H}$  0,13 M.

En el ensayo se utilizaron 50  $\mu\text{l}$  de la disolución por cada pocillo.

#### 5.4.3. Lecturas.

Para las lecturas de las absorbancias se utilizó un lector de ELISA microplaca.

El cálculo de las concentraciones se realizó con el programa: “*Ridasoft Win.NET*”, Versión 1.91.

Para las curvas de calibración se utilizaron los estándares provistos en el kit, que se procesaron por duplicado. Las curvas de calibración y sus coeficientes de regresión se muestran en las figuras 5.1 y 5.2.

Tanto las muestras como los estándares, se procesaron por duplicado.

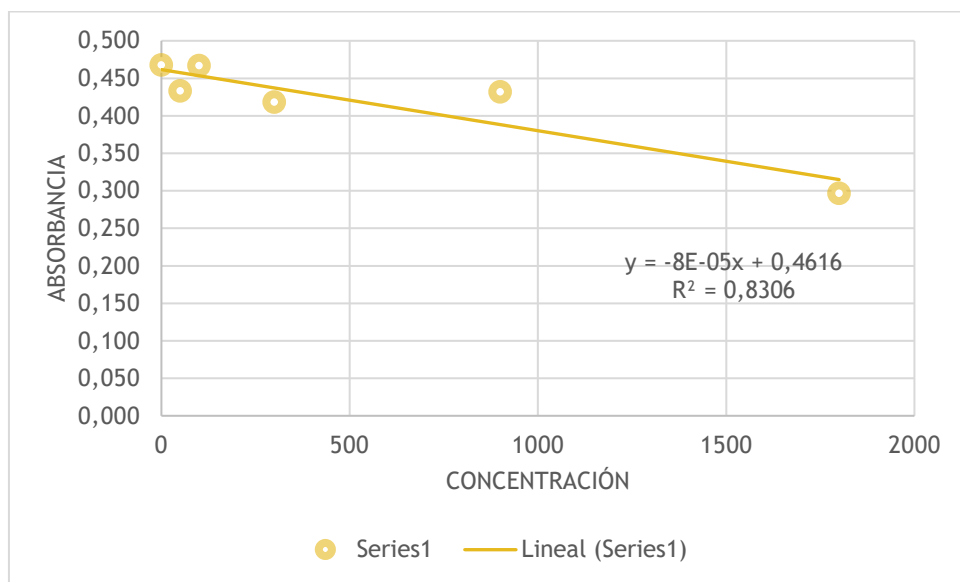


Figura 5.1. **Curva de Calibración centro CD-P.**

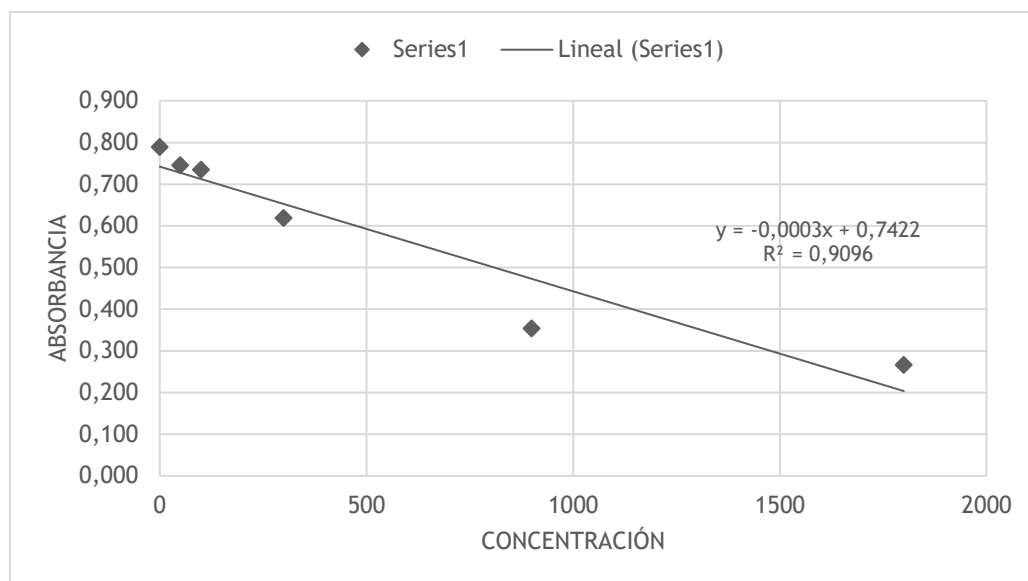


Figura 5.2. **Curva de Calibración centro CD-F.**

Las concentraciones están expresadas en partes por trillón (ppt) de la notación de EE. UU., que corresponde ng/L del sistema internacional.

### 5.5. Hábitos alimentarios.

Para conocer los hábitos alimentarios de la población en estudio se realizó una pequeña encuesta alimentaria a partir de la planilla del ANEXO 4. Se preguntó la frecuencia de consumo de los siguientes grupos de alimentos.

Cereales y derivados: cereales para el desayuno, pan, pan de molde, arroz, fideos, maíz pororó, alimentos infantiles.

Bebidas: gaseosas, vino tinto, cerveza industrial y artesanal, café molido e instantáneo, yerba mate: como mate, tereré o mate cocido, maní y pasas de uva.

### 5.6. Análisis de datos.

Los datos fueron analizados con los programas *Apache Open Office* 4.1.11 y *Statgraphics* 18.1.0.

## 6. Resultados.

### 6.1. Niveles de ocratoxina A.

Se procesaron 39 muestras de pacientes de dos centros de diálisis de la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, Argentina, entre los meses de junio y julio de 2014, de ambos sexos: 10 femeninos y 29 masculinos, con edades de entre 17 y 84 años, promedio de 56,8. Todas las muestras de suero analizadas presentaron niveles detectables de OTA, en un intervalo de 0,184 -2,959 ng/mL. Siete muestras, salieron de escala, por lo que fueron diluidas al medio y al cuarto, para que entren en el rango de calibración. Se obtuvieron 19 muestras del CD-P y 20 del CD-F.

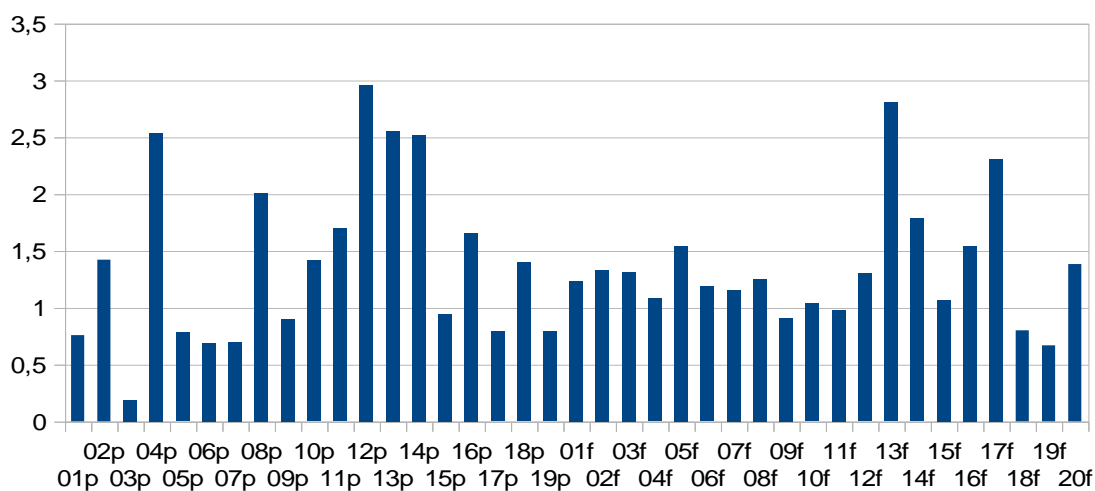
Los resultados se muestran en las tablas 6.1. y 6.2.

**Tabla 6.1.** Concentración de OTA hallada en suero de pacientes CD-P, con edad y sexo. M: masculino, F: femenino.

Muestra	Concentración (ng/mL)	Edad	Sexo
01P	0,757	44	M
02P	1,421	44	M
03P	0,184	42	M
04P	2,536	59	M
05P	0,781	62	F
06P	0,687	75	M
07P	0,699	72	M
08P	2,007	27	F
09P	0,901	59	M
10P	1,415	61	M
11P	1,697	56	M
12P	2,959	70	M
13P	2,554	72	M
14P	2,519	69	F
15P	0,946	65	M
16P	1,656	52	M
17P	0,789	45	M
18P	1,397	84	F
19P	0,790	24	M

**Tabla 6.2.** Concentración de OTA hallada en suero de pacientes del “centro CD-F”, con edad y sexo. M: masculino, F: femenino.

Muestra	Concentración (ng/mL)	Edad	Sexo.
01F	1,234	78	F
02F	1,331	56	M
03F	1,315	63	F
04F	1,081	17	M
05F	1,543	72	M
06F	1,187	31	M
07F	1,156	54	F
08F	1,250	28	M
09F	0,909	30	M
10F	1,037	48	F
11F	0,979	30	M
12F	1,298	51	M
13F	2,803	73	M
14F	1.,784	62	M
15F	1,066	50	M
16F	1,543	47	M
17F	2,305	62	M
18F	0,800	56	F
19F	0,668	31	F
20F	1,382	77	M



**Figura 6.1.** Diagrama de barras de concentraciones de OTA de ambos centros de salud. [ng/mL].

El centro CD-P, presentó un promedio de concentración media de OTA de 1,41 ng/mL y el centro CD-F, 1,33 ng/mL.

El promedio de las concentraciones de ocratoxina A halladas según sexo se muestran en la tabla 6.3 y la distribución de concentraciones por rango de edades, en la tabla 6.4

Aplicando la prueba “H” de Kruscal-Wallys, no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre los niveles de OTA y el sexo ni el rango de edad ( $p>0,05$ ).

**Tabla 6.3.** Concentraciones de OTA según sexo.

	Media	Mediana	Mínimo	Máximo
<b>[OTA](ng/mL)</b>	<b>1,368</b>	<b>1,250</b>	<b>0,184</b>	<b>2,959</b>
Masculino	1,395	1,298	0,184	2,959
Femenino	1,291	1,195	0,668	2,519

**Tabla 6.4.** Distribución de concentraciones de OTA por rango de edades.

Edad	Población	Media (ng/mL)	Mediana (ng/mL)
17-29	4	1,282	1,165
30-39	4	0,936	0,944
40-49	6	0,955	0,913
50-59	9	1,382	1,298
60-69	7	1,581	1,415
>69	9	1,695	1,397

## 6.2. Encuesta alimentaria.

A partir del análisis de las fichas de la encuesta alimentaria de 39 pacientes no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los niveles de ocratoxina A y los alimentos consumidos ( $p > 0,05$ ). Los resultados de la encuesta de hábitos alimenticios de los participantes se muestran en la tabla 6.5. El promedio semanal de consumo, se obtuvo de la relación entre los días de consumo reportado por cada participante en la semana para cada alimento encuestado y el número total de participantes (ver ANEXO 6).

**Tabla 6.5.** Encuesta de hábitos alimentarios.

Alimento		Promedio semanal de consumo (días)	Cantidad de perso- nas consumidoras y (%)	
Grupo	Tipo			
Cereales/derivados	Para desayuno	1,28	24	(61,5%)
	Farináceos/almidón	4,13	37	(94,9%)
	Arroz	1,95	37	(94,9%)
	Fideos	1,82	39	(100,0%)
	Maíz/choclo	1,59	39	(100,0%)
Bebidas	Gaseosas	1,49	26	(66,7%)
	Vino tinto	0,54	16	(41,0%)
	Cerveza	1,03	26	(66,7%)
Café	Molido	0,79	15	(35,9%)
	Instantáneo	3,36	33	(84,6%)
Yerba mate	Mate/mate cocido	5,03	37	(94,9%)
	Tereré	4,31	37	(94,9%)
Otros	Furtos secos	0,38	13	(30,8%)
	Frutas secas	0,40	16	(41,0%)



## 7. Discusión.

Las micotoxinas en general representan un problema que va en aumento y es un tema de preocupación para salud pública como así también, para la economía de los países productores de alimentos, por el deterioro de la salud humana debido a la exposición a bajas dosis que lleva al desarrollo de enfermedades crónicas(2) y por las pérdidas de la producción, debido a la contaminación de los cultivos y productos con micotoxinas(8,11), con el perjuicio económico que esto acarrea.

La ocratoxina A es una micotoxina contaminante natural de los alimentos, que se la puede encontrar en cereales y subproductos de cereales, semillas de cacao, legumbres, quesos, frutos secos como el maní, granos de café crudo y tostado, carnes ahumadas: jamón, tocino, embutidos, vinos, cerveza y otros géneros alimenticios(40).

Su principal acción es nefrotóxica, inmunosupresora, inmunotóxica, genotóxica, carcinogénica (clasificada en la categoría 2B de la IARC)(35,40) y teratogénica; puede afectar además del riñón, al hígado.

Estudios epidemiológicos muestran que, aproximadamente la mitad de la población europea está expuesta a OTA(1) y en ciertos países de África, el 95% de pacientes con nefropatías presentan niveles detectables de ésta, lo cual resalta la importancia de estudios locales.

En Argentina hay trabajos de dosaje de ocratoxina A en humanos, realizados en la provincia de Buenos Aires. Con respecto al Norte argentino en general y el NEA en particular, este es el primer trabajo de pesquisa en humanos.

En la Tabla 7.1 se muestran resultados de diferentes grupos de trabajo y el nuestro, donde se contrastan los niveles en sangre de ocratoxina A en pacientes sanos, con patología renal y embarazadas.

En el trabajo de Pacin y col. Tabla 7.1.[A], que midieron los niveles de ocratoxina A por HPCL en personas donantes de sangre en las localidades de Mar del Plata y General Rodríguez, provincia de Buenos Aires, la positividad de OTA en Mar del Plata fue de 63,8% y 62,3% en Gral. Rodríguez, con una mediana de 0,11 ng mL<sup>-1</sup> y 0,24 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente, valores sensiblemente inferiores a los obtenidos en nuestro trabajo, que mostró una mediana de 1,250 ng mL<sup>-1</sup>. Lo contrario ocurrió con sus valores máximos, que fueron ampliamente superiores; en la localidad de Mar del Plata, el valor máximo fue de

47,6 ng mL<sup>-1</sup> y en Gral. Rodríguez de 74,8 ng mL<sup>-1</sup>, en contraste con una mediana de 2,959 ng mL<sup>-1</sup>, en nuestro trabajo. En lo que respecta los niveles de ocratoxina en varones y mujeres, los autores encontraron diferencia estadística significativa en Gral. Rodríguez, pero no así en Mar del Plata, con valores superiores en varones, 0,4752 ng mL<sup>-1</sup> respecto a 0,2059 ng mL<sup>-1</sup> en mujeres, similar con nuestro resultado, que también mostró niveles superiores en varones respecto a las mujeres, 1,298 ng mL<sup>-1</sup> y 1,195 ng mL<sup>-1</sup> respectivamente, sin diferencias estadísticas significativas entre ambos.

En otros países de América Latina; como Chile, Muñoz y col. (Tabla 7.1.[B]) detectaron OTA en sangre de personas sanas de zonas agricultoras con una positividad de entre 50% y 90%, con rangos entre 0,07-2,75 ng mL<sup>-1</sup>. Mientras tanto que en Costa Rica, Guzmán y col. (Tabla 7.1.[C]), reportaron desde niveles no detectables de OTA, hasta 1,906 ng mL<sup>-1</sup> y 0,01 a 1,200 ng mL<sup>-1</sup> en sangre de bebedores de café y de cerveza, respectivamente, por el método de ELISA, con un 95% de positividad.

En el estudio de Kosicki R. y col.(Tabla 7.1.[D]), en pacientes dializados en Polonia analizados por cromatografía líquida de alto desempeño, obtuvieron un intervalo de niveles de ocratoxina A muy similares a los nuestros, en pacientes de características similares. Los pacientes controles, mostraron valores sensiblemente más bajos.

Tabla 7.1. Comparación de resultados con estudios de investigadores sobre niveles de ocratoxina A en sangre.						
Ref	Valores hallados [ng mL <sup>-1</sup> ]		Método	Tipo de pacientes	Lugar de estudio	Grupo de trabajo
	Intervalos	Mediana				
[A]	No presentado	0,24 0,11	HPLC	Donantes de sangre.	Gral. Rodríguez M. del Plata. Argentina.	Pacin(16).
[B]	[0,07 - 2,75] [0,22 - 2,12]	0,44 0,77	HPLC	Sanos de zonas agricultoras.	Calbún S. Vic., Chile	Muñoz(41)
[C]	[0,010 - 1,906]	0,622	ELISA	Bebedores de café y cerveza sí/no	Costa Rica	Guzmán (40)
[D]	[<0,1 - 2,78] [<0,1 - 2,53]	0,75 0,70	HPLC	Dializados Varones Mujeres.	Polonia	Kosicki(42)
[E]	[0,08 - 6,59]	0,29	HPLC	Pacientes sanos.	Marruecos	Filali(43)
[F]	[0,1 - 0,87]	0,17	HPLC	Sanos.	Líbano	Assaf(44)
[G]	[0,12 - 1,52]	0,45	HPLC	Pacientes con nefropatías.	Coimbra.	Dinis(45)
	[0,15 - 1,03]	0,42		Donantes de sangre	Aveiro. Portugal	
	[0,07 - 0,29]	0,18			Noruega	
[H]	[0,03 - 0,38]	0,21	fluorescencia	Personas sanas	Suecia	Thuvander(46)
[I]	[0,029 - 2,928]	0,169	HPLC	Mujeres.	Italia.	Di
	[0,194 ± 0,150]		fluorescencia	Varones.		Giuseppe(47)
	[0,271 ± 0,306]					
	[0,184 - 2,959]	1,25	ELISA	Dializados.	Posadas.	Velázquez y
	[0,668 - 2,519]			Mujeres.	Argentina.	col..
	[0,184 - 2,959]			Varones.		

En Marruecos, Filali, A. y col. (Tabla 7.1.[E]), obtuvieron una positividad para OTA de personas donantes de sangre de 60%, 61,5% para los varones y 56 para las mujeres. El nivel promedio de ocratoxina A fue de 0,29 ng mL<sup>-1</sup>, 0,31ng mL<sup>-1</sup> y 0,26 ng mL<sup>-1</sup> en mujeres y varones respectivamente. En cuanto al valor máximo de OTA detectado, de 6,59 ng mL<sup>-1</sup>, es notoriamente superior al obtenido en nuestro trabajo.

En los trabajos de Assaf y col. (Tabla 7.1.[F]). en el Líbano y Filali y col. (Tabla 7.1.[E]), en Marruecos, en personas sanas, obtuvieron una positividad de detección de OTA de 33% y 60%, respectivamente en contraste con el 100% de nuestros pacientes dializados. Con respecto a los niveles de ocratoxina A, ambos estudios, mostraron similitudes con el nuestro en cuanto al valor mínimo, pero amplias diferencias en el máximo. El grupo de Assaf obtuvo un valor muy superior a nuestro valor máximo, mientras que el grupo de Filali, halló un valor sensiblemente inferior. Puede observarse claramente una gran amplitud en los niveles hallados de ocratoxina A, sobre todo pensando en que contrastamos personas sanas contra pacientes en diálisis, además de la diferente metodología de cuantificación, HPLC y ELISA.

En Portugal, los niveles de ocratoxina A hallados por Dinis y col. (Tabla 7.1.[G]). En pacientes con formas de nefropatía, se encuentran en el orden de los nuestros con pacientes de características similares, con valores de nivel máximo menor.

Thuvander y col, (Tabla 7.1.[H]), en pacientes donantes de sangre, encontraron muy bajos niveles en comparación con nuestros resultados utilizando la técnica de referencia para detección de ocratoxina A, al igual que en Italia, Di Giuseppe y col. (Tabla 7.1.[I]) con valores también inferiores a los nuestros en pacientes sanos, con la discrepancia de que encontraron diferencias estadísticas significativas entre varones y mujeres. Mostrando divergencias sensibles entre aquellas personas sanas y nuestros pacientes con insuficiencia renal.

Los alimentos son la principal vía de exposición a OTA, principalmente los cereales y sus productos, frutos secos como el maní, frutas secas como las pasa de uva, café, vino, principalmente tinto, cerveza, bebidas gaseosas(2) entre otras.

En Argentina, el trabajo de Motta(3) en Mar del Plata y Gral. Rodríguez, provincia de Buenos Aires en donantes del banco de sangre, mostró que los alimentos más consumidos por la población fueron los cereales y sus derivados, el 75% y 67,8% consumía diariamente productos farináceos y semanalmente, el 83% y 77,1% consumía fideos, en Mar del Plata y Gral. Rodríguez, respectivamente. Estos resultados muestran similitudes con los del presente estudio en cuanto a que los cereales y derivados son los alimentos más consumidos donde

el 94,9% consumía en promedio 4 veces por semana productos farináceos y el 100%, 2 veces por semana fideos, en promedio; en contraste, se puede observar que los niveles de consumo de nuestros participantes son más elevados.

En el trabajo de Muñoz y col. (41), en dos zonas agrícolas de Chile, no encontraron diferencias significativas en el consumo de alimentos, salvo en los cereales, donde se observó una alta ingesta en la zona cerealera, que mostró 229,40 y 329,56 g/día y se puede relacionar con el hecho de que el 90% de nuestros participantes dijeron consumir cereales y subproductos aproximadamente 2 veces por semana en promedio. Hábitos similares se presentaron en Croacia Klapac y col. (48),  $238,38 \pm 83,3$  g/día, resultado que también coinciden con Coronel y col.(49), en el cual este grupo de alimentos fueron los de mayor consumo entre los participantes del trabajo, encontrando asociación significativa entre el consumo de estos productos, con niveles máximos de OTA estandarizados por la agencia de control de la Unión Europea y los niveles de OTA. Una asociación más estrecha fue encontrada al comparar los niveles hallados en los alimentos contaminados con OTA y los encontrados en orina de OTA y OT $\alpha$ . Cabe señalar que esa relación escapa a los objetivos de este trabajo.

En el trabajo de A. Thuvander y col.(46), en Noruega y Suecia, donde buscaron relación entre altos niveles de OTA en plasma ( $0,18 \pm 0,11$  ng mL<sup>-1</sup> en Noruega y  $0,21 \pm 0,17$  ng mL<sup>-1</sup> en Suecia) con el consumo de ciertos alimentos, contrastándolos con diferente consumo y bajos niveles de OTA, no encontraron diferencias significativas, resultados que coinciden con los hallados en el presente trabajo. Los alimentos consumidos en grandes cantidades por los participantes de altos niveles de ocratoxina A eran, morcilla, garbanzos, higos, café, cerveza y vino tinto; los mismos alimentos que consumían los participantes que tenían bajos niveles, con excepción de cerveza y vino tinto, lo que contrasta con nuestros pacientes, donde el 41% y 66% respondieron que bebían vino tinto y cerveza respectivamente, en baja cantidad, debido a la enfermedad actual y lo hacían en promedio, en el caso del vino tinto, 1 vez cada dos semanas y 1 vez por semana cerveza. El punto de encuentro entre ambos estudios es en relación al consumo de cereales, donde se observó altos niveles de OTA con alto consumo de cereales y derivados, pero sin diferencias estadísticas significativas.

En la revisión bibliográfica de Peraica y col.(50), sobre la contaminación de los alimentos con ocratoxina A en Croacia, se observó niveles más altos en la zona de la nefropatía endémica de los Balcanes que en otras regiones del país, como así también los niveles en sangre de la población sana. Encontraron también, contaminación en maíz para consumo

animal y bajos niveles en trigo, legumbres y vino en las zonas no endémicas de la nefropatía de los Balcanes, indicando una exposición no significativa a esta micotoxina en humanos. Hecho que puede relacionarse con lo observado en este trabajo, donde no se encontró una asociación de altos niveles de OTA y el tipo de alimentos consumidos, plausibles de contaminación con la micotoxina.

## 8. Conclusiones.

Se logró evaluar los niveles de ocratoxina A en la sangre de pacientes dializados de la ciudad de Posadas, provincia de Misiones, Argentina.

Se pudo conocer los hábitos alimenticios de los pacientes a través de una pequeña encuesta, delimitando a alimentos seleccionados, teniendo en cuenta los más frecuentemente asociados a contaminación con OTA, según las publicaciones consultadas.

- Consideraciones finales.

Conocer más sobre los niveles de las micotoxinas en general y la ocratoxina A en particular en la población general es un aporte para evaluar la calidad de alimentos disponibles en el mercado, a través de un ensayo rápido y accesible a laboratorios de mediana complejidad, contribuyendo así a mejorar la calidad alimentaria de la población y, por ende, la salud pública y la calidad de vida.

## 9. Perspectivas a futuro.

Se pretende ampliar el universo muestral y extender a otros grupos de interés: personas gestantes, pacientes con patologías hepáticas y oncológicas hasta alcanzar a testear a personas sanas.

Se programa robustecer el estudio analizando por este método de ELISA alimentos susceptibles de contaminación con ocratoxina A, principalmente los de producción para consumo propio, para así conocer los niveles de esta micotoxina en estos y compararlo con los niveles en los consumidores.

La cromatografía líquida de alto rendimiento con detector de fluorescencia es la técnica de referencia para la búsqueda de OTA y para completar el estudio, se buscará confirmar los resultados y compararlos con el rendimiento del ELISA.

Por último, hay poca información sobre la exposición humana a OTA y otras micotoxinas en simultáneo y los efectos sobre la salud humana. Se pretende ampliar el estudio a otras micotoxinas para conocer el comportamiento en nuestra región.



## 10. Bibliografía.

1. Gimeno A, Lúgia Martins M. Riesgos de micotoxicosis que algunas micotoxinas como contaminantes de los alimentos pueden provocar en humanos [Internet]. SITIO ARGENTINO DE PRODUCCIÓN ANIMAL. Repositorio Digital de Acceso Abierto. 2004 [citado 5 de febrero de 2016]. p. 1–15. Disponible en: <http://www.produccion-animal.com.ar>
2. González Salgado A. Diagnóstico y control de especies de *Aspergillus* productoras de Ocratoxina A [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2010. Disponible en: <http://www.ucm.es>
3. Motta EL. Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz [Internet]. Biblioteca Central “Dr. Luis Federico Leloir”. FCENA - UBA. “Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>”; 2009. Disponible en: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_4447\\_Motta.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_4447_Motta.pdf)
4. Munitz M. Arándanos: micoflora contaminante, micotoxinas, residuos de fungicidas y cinéticas de degradación [Internet]. Biblioteca Central “Dr. Luis Federico Leloir”. FCENA - UBA. “Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar>”; 2013. Disponible en: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5270\\_Munitz.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5270_Munitz.pdf)
5. Soriano del Castillo JM, Et Al. Micotoxinas en alimentos [Internet]. 1º. Díaz de Santos, editor. Madrid: Díaz de Santos; 2007. 393 p. Disponible en: <http://www.diazdesantosexico.com.mx/wwwdat/pdf/9788479788087.pdf>
6. Juan García C. Análisis de aflatoxina y ocratoxina A en alimentos y evaluación de la ingesta poblacional [Internet]. Vasa. Universitat de València; 2008. Disponible en: <http://medcontent.metapress.com/index/A65RM03P4874243N.pdf>
7. Gimeno A, Lúgia Martins M. Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos [Internet]. 3º. Special Nutrients, Inc. Miami; 2011. 130 p. Disponible en: [http://szcitrex.com/download/books/3 edición MICOTOXINAS LR Secure.pdf](http://szcitrex.com/download/books/3%20edicion%20MICOTOXINAS%20LR%20Secure.pdf)
8. Castillo Tamayo EC. Caracterización y potencialidad de producción de micotoxinas de especies del género *Fusarium* procedentes de grano de trigo fideo *Triticum durum*

- Desf. [Internet]. 2019. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/73752>
9. Perusia OR, Rodríguez RA. Micotoxosis. *Rev Investig Vet del Peru*. 2001;12(2):87–116.
  10. Pitt JI. Toxigenic fungi: which are important? *Med Mycol*. 2000;38(1):17–22.
  11. Abrunhosa L, Morales H, Soares C, Calado T, Vila-Chã A, Pereira M, et al. Micotoxinas Detectadas En Productos Alimenticios En Portugal: Revisión. *Rev Bio Ciencias*. 2012;2(1):5–31.
  12. Cano-Sancho G, Marín S, Ramos AJ, Sanchis V. Micotoxinas. Estudio de dieta total en Cataluña 2008-2009 [Internet]. Segunda Ed. Agencia de Salud Pública de Cataluña, Agencia Catalana de Seguridad Alimentaria, editores. Barcelona: Generalitat de Catalunya; 2012. Disponible en: [http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir2911/edt\\_micotoxines5m1.pdf](http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir2911/edt_micotoxines5m1.pdf)
  13. Niaz K, Shah SZA, Khan F, Bule M. Ochratoxin A–induced genotoxic and epigenetic mechanisms lead to Alzheimer disease: its modulation with strategies. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(36):44673–700.
  14. Rojas-Jaimes J. Evaluación del nivel de contaminación por la micotoxina OTA en Páprika usando ELISA y HPLC. *Horiz Med (Barcelona)*. 2008;8(2):48–52.
  15. Chanique GD. “Estudios sobre el comportamiento electroquímico de la micotoxina patulina y desarrollo de metodologías electroanalíticas para su determinación en alimentos” [Internet]. Universidad Nacional de Río Cuarto; 2012. Disponible en: <https://repodigital.unrc.edu.ar/xmlui/handle/123456789/71174>
  16. Pacin AM, Ciancio Bovier E V., Motta E, Resnik SL, Villa D, Olsen M. Survey of argentinean human plasma for ochratoxin A. *Food Addit Contam* [Internet]. 2008;25(5):635–41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18473217>
  17. Malir F, Ostry V, Pfohl-leszkowicz A, Malir J, Toman J. Ochratoxin A : 50 Years of Research. *Toxins (Basel)* [Internet]. 2016;8(191):12–5. Disponible en: [extension://mbcgpelmjnpfbdnkbebdlfjmeckpnhha/enhanced-reader.html?pdf=https%3A%2F%2Fbrxt.mendeley.com%2Fdocument%2Fcontent%2F4001086d-9886-33d3-8b30-0495382276a2](https://mbcgpelmjnpfbdnkbebdlfjmeckpnhha/enhanced-reader.html?pdf=https%3A%2F%2Fbrxt.mendeley.com%2Fdocument%2Fcontent%2F4001086d-9886-33d3-8b30-0495382276a2)
  18. Mendoza SR, Rodríguez AG, Fernández PSP, Vázquez MG, Montero CJC, Benítez MJ. Micotoxinas: ¿Qué son y cómo afectan a la salud pública? *Rev Digit Univ*

- [Internet]. 2017;18:12. Disponible en:  
[http://www.revista.unam.mx/vol.18/num6/art46/PDF\\_art46.pdf](http://www.revista.unam.mx/vol.18/num6/art46/PDF_art46.pdf)
19. Pozas Selva R, Abad Acinas J. Adsorción de Micotoxinas Presentes en los Alimentos Mediante Biopolímeros [Internet]. Vilanova i la Geltru, Barcelona, Catalunya, España; 2010. Disponible en:  
<http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/10058/Memoria.pdf>
  20. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Cabañas FJ. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev Iberoam Micol [Internet]. 2000;17(Enero 2000):S63–8. Disponible en:  
[https://www.researchgate.net/publication/239603267\\_Hongos\\_productores\\_de\\_micotoxinas\\_emergentes](https://www.researchgate.net/publication/239603267_Hongos_productores_de_micotoxinas_emergentes)
  21. Gimeno A. Principales factores condicionantes para el desarrollo de los hongos y la producción de micotoxinas [Internet]. Vol. 35, Engormix. 2002. p. 84–5. Disponible en: [https://www.engormix.com/micotoxinas/micotoxinas-silaje/principales-factores-condicionantes-desarrollo\\_a26065/](https://www.engormix.com/micotoxinas/micotoxinas-silaje/principales-factores-condicionantes-desarrollo_a26065/)
  22. Bezerra da Rocha ME, da Chagas OliveiraFreire F, Feitosa Maia FE, Florindo Guedes MI, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. Food Control [Internet]. 2014;36(1):159–65. Disponible en:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.021>
  23. Battilani P, Palumbo R, Giorni P, Asta CD, Dellafiora L, Toscano P, et al. Mycotoxin mixtures in food and feed : holistic , innovative , flexible risk assessment modelling approach : MYCHIF. 2020;(December 2019).
  24. Peraica M, Radic B, Lucic A, Pavlovic M, Radic B. Efectos tóxicos de las micotoxinas en el ser humano. 2000;
  25. Rojas-Jaimes J. Comparación entre los sistemas ELISAS y el HPLC usando los kits de NEOGEN “VERATOX” y R-BIOPHARM para análisis de ocratoxina en muestras de p  prika. Engormix [Internet]. 2011 [citado 8 de abril de 2015];1–9. Disponible en: <http://www.engormix.com/MA-micotoxinas/articulos/comparacion-entre-sistemas-elisas-t1991/p0.htm>.
  26. Sorrenti V, Di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Bognanno M, Galvano F. Toxicity of ochratoxin A and its modulation by antioxidants: A review. Toxins (Basel)

- [Internet]. 2013;5(10):1742–66. Disponible en: [www.mdpi.com/journal/toxins](http://www.mdpi.com/journal/toxins)
27. Wang L, Hua X, Jing N, Lv B, Liu L, Chen Y. Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon* [Internet]. 30 de abril de 2022;210(February):11–8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.010>
  28. Tozlovanu M, Faucet-Marquis V, Pfohl-Leszkowicz A, Manderville RA. Genotoxicity of the Hydroquinone Metabolite of Ochratoxin A : Structure-Activity Relationships for Covalent DNA Adduction. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2006;(19):1241–7. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16978030/>
  29. Visagie CM, Varga J, Houbaken J, Meijer M, Kocsis S, Yilmaz N, et al. Ochratoxin production and taxonomy of the yellow aspergilli (*Aspergillus* section *Circumdati*). *Study Mycol* [Internet]. 2014;78:1–61. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4255584/pdf/main.pdf>
  30. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi, A.M.S. Figueras MJ, Vitale RG. *Atlas of Clinical Fungi* [Internet]. 2023 [citado 9 de septiembre de 2023]. Disponible en: <https://www.clinicalfungi.org/page/Home>
  31. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. Vol. 159, *Chemico-Biological Interactions*. 2006. p. 18–46.
  32. Castrillo ML, Jerke G, Horiński MA. Detección de la producción de ocratoxina A por cepas de *Aspergillus* sección *Nigri* aisladas de yerba mate compuesta [Internet]. *Revista Mexicana de Micología*. Ciudad de México, DF.: Sociedad Mexicana de Micología; 2014. p. 1–6. Disponible en: <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/35969>
  33. Domijan A-M, Peraica M. *Carcinogenic Mycotoxins*. Elsevier Ltd. 2010;125–37.
  34. López de Cerain A, Jiménez AM, Ezpelata O, Bello J. Efectos tóxicos de la Ocratoxina A. *Rev Toxicol*. 2000;17(2):61–9.
  35. Pacini A. Micotoxicosis por ocratoxina A. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam*. 1990;XXIV(4):385–99.
  36. Tao Y, Xie S, Xu F, Liu A, Wang Y, Chen D, et al. Ochratoxin A : Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2018;112(January):320–31. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.01.002>
  37. Vettorazzi A, González-Peñas E, López de Cerain A. Ochratoxin A kinetics: a review of analytical methods and studies in rat model. *Food Chem Toxicol*. 2009;72,

octubr:273–88.

38. Arbillaga L, Ezpeleta O, López de Cerain A. ¿ Es la Ocratoxina A una micotoxina mutagénica ? 2004;1–10.
39. Khoi CS, Chen JH, Lin TY, Chiang CK, Hung KY. Ochratoxin a-induced nephrotoxicity: Up-to-date evidence [Internet]. Vol. 22, International Journal of Molecular Sciences. 2021. p. 20. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/ijms222011237>
40. Guzmán EMQ, Guerrero FA, Chaves JA. Determinación de ocratoxina A en plasma humano y en café de Costa Rica por un método de ELISA. Arch Latinoam Nutr. 2007;57(2):168–72.
41. Muñoz K, Vega M, Rios G, Muñoz S, Madariaga R. Preliminary study of Ochratoxin A in human plasma in agricultural zones of Chile and its relation to food consumption. Food Chem Toxicol. 2006;44(11):1884–9.
42. Kosicki R, Buharowska-Donten J, Twarużek M. Ochratoxin A levels in serum of Polish dialysis patients with chronic renal failure. Toxicon. 2021;200:183–8.
43. Filali A, Betbeder AM, Baudrimont I, Benayada A, Soulaymani R, Creppy EE. Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey. Hum Exp Toxicol [Internet]. 2002;21(5):241–5. Disponible en: <http://het.sagepub.com/cgi/content/abstract/21/5/241>
44. Assaf H, Betbeder A-M, Creppy EE, Pallardy M, Azouri H. Ochratoxin A levels in human plasma and foods in Lebanon. Hum Exp Toxicol [Internet]. 2004;23(10):495–501. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15553175>
45. Dinis AMP, Lino CM, Pena AS. Ochratoxin A in nephropathic patients from two cities of central zone in Portugal. J Pharm Biomed Anal. 2007;44(2):553–7.
46. Thuvander A, Paulsen JE, Axberg K, Johansson N, Vidnes A, Enghardt-Barbieri H, et al. Levels of ochratoxin A in blood from Norwegian and Swedish blood donors and their possible correlation with food consumption. Food Chem Toxicol. 2001;39(12):1145–51.
47. Di Giuseppe R, Bertuzzi T, Rossi F, Rastelli S, Mulazzi A, Capraro J, et al. Plasma ochratoxin A levels, food consumption, and risk biomarkers of a representative sample of men and women from the Molise region in Italy. Eur J Nutr.

2012;51(7):851–60.

48. Klapac T, Šarkanj B, Banjari I, Strelec I. Urinary ochratoxin A and ochratoxin alpha in pregnant women. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(12):4487–92.
49. Coronel MB, Marin S, Tarragó M, Cano-Sancho G, Ramos AJ, Sanchis V. Ochratoxin A and its metabolite ochratoxin alpha in urine and assessment of the exposure of inhabitants of Lleida, Spain. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(6):1436–42.
50. Peraica M, Flajs D, Domijan A-M. Ochratoxin A Contamination of Food from Croatia. *Toxins (Basel).* 2010;2:2098–105.

## 11. Anexos.

### 11.1. Anexo 1. Nombre IUPAC de aflatoxinas.

- **Aflatoxina B1.**

2,3,6a  $\alpha$ , 9a  $\alpha$ -tetrahidro-4-metoxiciclopenta [c] furo [3',2':4, 5] furo [2,3-h] [1] benzo-pirano-1,11-diona.

- **Aflatoxina B2.**

2, 3, 6a, 8, 9, 9a  $\alpha$  -hexadidro-4-metoxiciclopenta [c] furo [3',2': 4,5] furo [2,3-h] [1] benzo-pirano-1,11-diona.

- **Aflatoxina G1.**

3, 4, 7a, 10a-tetrahidro-5-metoxi-1h, 12h-furo-[3',2': 4,5] furo [2,3-h]- pirano [3,4c] [1]-benzopirano-1,12-diona.

- **Aflatoxina G2.**

3, 4, 7a, 9, 10, 10a  $\alpha$ -hexahidro-5-metoxi-1h, 12h-furo [3',2': 4,5] furo [2,3-h]-pirano-[3,4c] [1]-benzopirano-1,12-diona.

- **Aflatoxina B2a.** 2-hidroxi derivado de B2.

- **Aflatoxina G2a.** 2-hidroxi derivado de G2.

11.2. Anexo 2. Tabla A1. Propiedades fisicoquímicas de aflatoxinas.

Aflatoxina	Forma	P.F (Celsius)	Fluorescencia	UV máx. (EtOH)	Peso molecular [g/mol]	Fórmula molecular.
Aflatoxina B <sub>1</sub>	Cristales	268–269	Azul	362nm	312,0633	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Aflatoxina B <sub>2</sub>	Cristales	286–289	Azul	363 nm	314,0790	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>
Aflatoxina G <sub>1</sub>	362 nm.	244–246	Verde	362 nm	328,0582	C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>
Aflatoxina G <sub>2</sub>	Cristales	237–240	Verde	363 nm	330,0739	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
Aflatoxina B <sub>2a</sub>	-	-	-	-	330,0739	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>7</sub>
Aflatoxina G <sub>2a</sub> .	-	-	-	-	346,0688	C <sub>17</sub> H <sub>14</sub> O <sub>8</sub>



11.3. Anexo 3. Acta de consentimiento informado.

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Lugar y fecha \_\_\_\_\_.

El/la que suscribe \_\_\_\_\_, fecha de nacimiento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_,

Letra imprenta mayúscula.

DNI N° \_\_\_\_\_, con domicilio \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, a cargo del paciente \_\_\_\_\_,

Letra imprenta mayúscula.

fecha de nacimiento \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, DNI N° \_\_\_\_\_, con  
domicilio \_\_\_\_\_, declaro ser (relación  
con el paciente) \_\_\_\_\_, otorgo mi consentimiento a la toma de muestra clínica

(extracción de sangre) y entrevista propuestas por el Bioquímico Ernesto Velázquez, matrícula profesional N° 533 del Colegio de Bioquímicos de la Provincia de Misiones, para la determinación de ocratoxina A en mi muestra de sangre, en el marco de la tesis de Maestría en Micología Médica titulada: “Niveles de Ocratoxina A en Pacientes Dializados de la Ciudad de Posadas” de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional del Nordeste.

- ❖ A propósito declaro haber sido informado y haber comprendido el propósito de tal estudio.
- ❖ Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas y han sido respondidas a mi entera satisfacción.
- ❖ Se me ha explicado claramente que el objetivo de prestar este consentimiento es para poder realizar en el futuro estudios de investigación, cuyos resultados podrán ser difundidos, manteniendo absoluta confidencialidad de mis datos personales.
- ❖ Comprendo que los resultados de futuros estudios no se comunicarán ni a mí ni a mi médico. Sólo en el caso de que dichos hallazgos tengan una implicancia significativa para la salud y que exista una posibilidad real de mejorar esa condición de salud, podremos recibir, tanto mi médico como yo la información pertinente.

Por todo ello, **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** voluntariamente para que se pueda realizar, a partir de la muestra de sangre que me han tomado y/o derivados, todos los estudios de investigación referentes a esta tesis de posgrado.

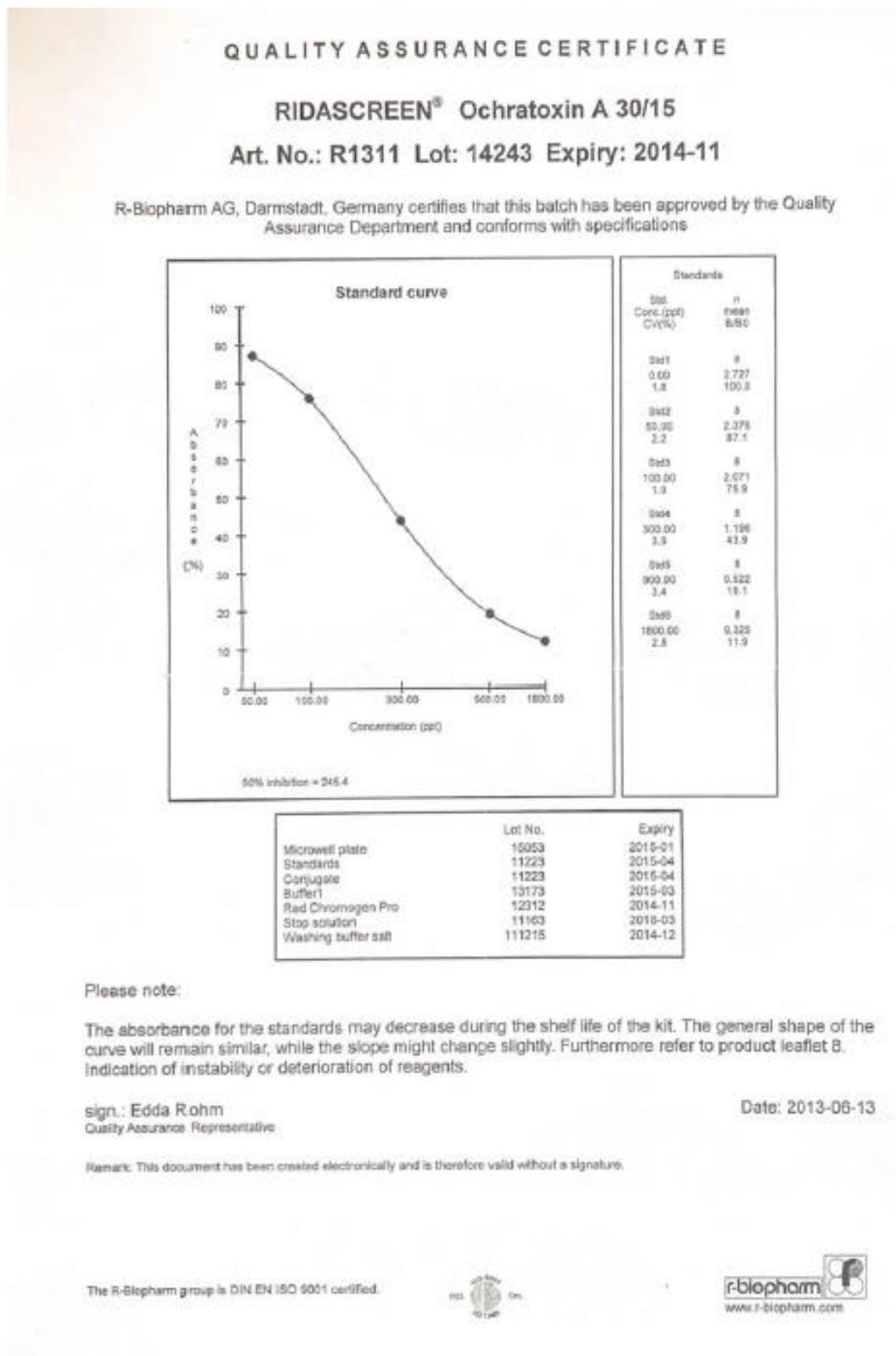
\_\_\_\_\_  
Firma paciente o padre, madre, tutor,  
familiar a cargo o autoridad pertinente.

\_\_\_\_\_  
ERNESTO VELÁZQUEZ  
BIOQUÍMICO MP 533  
TESISTA

11.4. Anexo 4. Planilla de la encuesta alimentaria.

Grupo de alimento	Tipo específico	Frecuencia de consumo semanal
Cereales y derivados	Para el desayuno	
	Productos con harina/almidón	
	Arroz	
	Fideos	
	Maíz/choclo	
Bebidas	Gaseosas	
	Vino tinto	
	Cerveza	
Café	Molido	
	Instantáneo	
Yerba mate	Mate/ mate cocido	
	Tereré	
Frutas secas		
Frutos secos		

11.5. Anexo 5. Certificado de calidad del Test de ELISA.



11.6. Anexo 6. Tabla pacientes-niveles de OTA-encuesta alimentaria.

• TABLA A6.1. CENTRO CD-P.

P	OTA	Ed	S	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
01	0,76	44	M	7	1	2	1	1	2	2	1	0	2	7	7	0	1
02	1,42	44	M	5	2	2	1	1	2	0	2	0	2	7	7	0	0
03	0,18	42	M	5	1	2	1	1	1	0	2	0	5	7	7	0	1
04	2,54	59	M	3	1	3	2	3	0	0	1	0	5	7	7	0	0
05	0,78	62	F	2	0	3	1	1	0	1	1	0	2	7	3	0	0
06	0,69	75	M	3	0	2	3	1	0	2	2	0	2	5	3	0	1
07	0,70	72	M	0	0	3	1	1	0	0	0	0	5	5	2	1	0
08	2,01	27	F	0	0	2	3	1	1	0	2	2	2	7	2	0	0
09	0,90	59	M	3	1	1	3	1	2	0	1	0	2	7	2	0	1
10	1,41	61	M	3	5	1	3	2	3	0	0	0	5	7	1	0	1
11	1,70	56	M	4	2	2	1	3	4	0	2	2	5	0	1	1	0
12	2,96	70	M	2	2	1	3	3	0	0	2	0	7	7	0	0	1
13	2,55	72	M	3	0	3	1	1	4	1	1	1	7	7	5	0	0
14	2,52	69	F	7	1	2	3	1	4	0	1	5	5	0	0	0	0
15	0,95	65	M	3	1	2	3	2	1	0	0	2	2	5	1	1	1
16	1,66	52	M	7	3	2	2	1	7	2	1	2	2	5	1	0	0
17	0,79	45	M	5	3	2	1	1	4	0	2	2	7	6	5	0	0
18	1,40	84	F	7	4	3	1	1	0	1	2	0	7	6	5	0	1
19	0,79	24	M	2	4	1	2	2	2	0	0	0	7	7	4	0	0

Ref. P; paciente. OTA; concentración de OTA en sangre. Ed; edad. S; sexo biológico. A; cereales para el desayuno. B; productos con harina/almidón. C; Arroz. D; fideos. E; maíz/choclo. F; gaseosas. G; vino tinto. H; cerveza. I; café molido. J; café instantáneo. K; mate/mate cocido. L; tereré. M; frutas secas. N; furtos secos.

• TABLA A6.2. CENTRO CD-F.

P	OTA	Ed	S	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
01	1,23	30	M	7	0	1	2	1	0	0	0	1	7	7	4	2	1
02	1,33	73	M	3	1	0	3	1	0	0	1	1	7	2	7	0	0
03	1,31	62	M	5	5	0	3	3	1	1	1	0	2	2	5	0	0
04	1,08	62	M	5	0	1	1	3	0	2	2	1	5	1	5	0	2
05	1,54	72	M	2	0	2	1	1	1	0	2	0	5	1	7	0	0
06	1,19	51	M	2	2	3	1	1	2	0	2	0	0	4	6	1	0
07	1,16	17	M	7	1	3	2	2	2	1	0	1	0	7	6	0	0
08	1,25	77	M	4	0	3	2	2	1	2	0	0	0	7	7	0	0
09	0,91	50	M	5	3	3	1	1	2	1	1	0	0	7	7	1	1
10	1,04	63	F	7	0	2	3	1	0	0	0	0	1	7	5	0	0
11	0,98	48	F	5	0	3	1	3	0	0	2	0	1	1	4	1	0
12	1,30	30	M	3	0	1	3	3	2	0	0	0	3	1	4	1	1
13	2,80	31	M	7	1	2	1	1	0	1	0	0	3	1	5	1	0
14	1,78	78	F	1	1	3	3	2	1	0	0	1	0	7	5	1	0
15	1,07	31	F	7	0	2	1	1	0	1	0	0	4	7	4	0	1
16	1,54	56	F	5	3	1	1	2	1	1	1	0	2	5	6	2	1
17	2,31	28	M	7	0	1	1	3	1	1	1	5	1	5	7	0	0
18	0,80	54	F	4	0	3	1	1	2	0	2	0	7	7	7	2	1
19	0,67	56	M	2	1	2	1	1	2	0	2	0	0	7	2	0	0
20	1,38	47	M	2	1	1	3	1	3	1	0	5	2	1	2	0	1

Ref. P; paciente. OTA concentración de OTA en sangre. Ed; edad. S; sexo biológico. A; cereales para el desayuno. B; productos con harina/almidón. C; Arroz. D; fideos. E; maíz/choclo. F; gaseosas. G; vino tinto. H; cerveza. I; café molido. J; café instantáneo. K; mate/mate cocido. L; tereré. M; frutas secas. N; furtos secos.