

Efectos tóxicos de alternariol por ensayos *in vitro*: revisión

Juan-García A*, Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ

Laboratorio de Toxicología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, València, Spain

Recibido 8 de septiembre de 2014 / Aceptado 15 de octubre de 2014

Resumen: Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. Las micotoxinas más abundantes son aflatoxinas (*Aspergillus*), ocratoxina A (*Penicillium*), fumonisinas, zearalenona, deoxinivalenol (*Fusarium*) y alternariol (*Alternaria*). De las especies de *Alternaria*, *A. alternata* es la especie productora más importante de micotoxinas. Todas están consideradas como contaminantes tóxicos que están presentes en alimentos de consumo diario. Esta revisión se centra en estudios *in vitro* relacionados con la respuesta y citotoxicidad a la micotoxina de *Alternaria*, alternariol (AOH). Para ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los artículos de AOH disponible en bases de datos como: Pubmed, Scopus, Science Direct y Current Contents en los últimos catorce años. Así pues, el objetivo de la revisión bibliográfica es evaluar los efectos de AOH investigados mediante ensayos *in vitro*.

Palabras clave: alternariol; *in vitro*; revisión;

Abstract: Toxic effects of alternariol by *in vitro* assays: a review. Mycotoxins are secondary metabolites produced by genera fungus of: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* and *Alternaria*. The most frequent mycotoxins are: aflatoxins (*Aspergillus*), ochratoxin A (*Penicillium*), fumonisins, zearalenone, deoxynivalenol (*Fusarium*) and alternariol (*Alternaria*). Among all *Alternaria* spp, *A. Alternata* is the most producer mycotoxin. All mycotoxins are considered toxic contaminants present in food of daily consumption. This review is based on *in vitro* studies where response and toxicity in cells of *Alternaria* mycotoxin, alternariol (AOH) have been carried out. In this sense a bibliographic search of AOH papers available in on-line data bases such as: Pubmed, Scopus, Science Direct and Current Contents in the last fourteen years, have been collected. The main objective of this bibliographic review is to evaluate the AOH effects detected in *in vitro* assays.

Keywords: Alternariol: *in vitro*; review

Introducción

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producido por hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria*. La micotoxinas más abundantes (Tabla 1) son aflatoxinas (*Aspergillus*), ocratoxina A (*Penicillium*), fumonisinas, zearalenona, tricotecenos (*Fusarium*) y alternariol (*Alternaria*). En la actualidad se conocen un total de 400 micotoxinas diferentes [1]. La micotoxinas son muy difíciles de eliminar y/o de erradicar a lo largo de toda la cadena alimentaria [2]. Los climas cálidos proporcionan las condiciones adecuadas e idóneas para conseguir el crecimiento de hongos de los

géneros mencionados y la síntesis de las micotoxinas. La producción de micotoxinas puede verse favorecida por condiciones ecológicas adecuadas alcanzadas durante la recolecta, secado, manejo, embalaje, transporte y almacenamiento de los alimentos contaminados con hongos, tales como humedad, temperatura y actividad del agua del alimento [3,4].

Todas las micotoxinas están consideradas como contaminantes tóxicos que están presentes en alimentos de consumo diario. De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) aproximadamente un 25% de la producción mundial de cereales está contaminada de micotoxinas; además, especias, hierbas para infusiones, fruta, frutos secos, semillas y productos derivados de estos, están contaminados también por micotoxinas [4-8].

Las micotoxinas provocan efectos tóxicos crónicos muy diversos en animales y humanos como: hepatotoxicidad, genotoxicidad, nefrotoxicidad, neurotoxicidad, efectos sobre la reproducción, inmunotoxicidad, etc. En la Tabla 2 se recogen las micotoxinas más comunes presentes en alimentos y sus efectos tóxicos. La toxicidad puede variar dentro de un mismo grupo estructural de micotoxinas y el efecto lo puede producir tanto la misma micotoxina como los metabolitos derivados de ella [2].

Debido a la toxicidad que las micotoxinas presentan y a su presencia en alimentos, la Comisión Europea ha establecido límites máximos que se recogen en los Reglamentos 1881/2006 del 19 de Diciembre de 2006 [9] y 1126/2007 de 28 Septiembre de 2007 [10]. Existen niveles máximos para aflatoxinas, ocratoxina A, patulina y micotoxinas de *Fusarium* (zearalenona, fumonisina, deoxinivalenol, y toxinas T-2 y HT-2) [9,10] que van de 0,5 µg/kg para ocratoxina A (en cereales para alimentos infantiles) a 4000 µg/kg para fumonisinas (en maíz sin procesar). No obstante, existen micotoxinas que todavía no presentan niveles legislados, como es el caso de las micotoxinas del género *Alternaria*; de ahí, la importancia de estudiar este tipo de micotoxinas.

Las especies de *Alternaria* son los patógenos post-cosecha más comunes presentes en frutas (melones, manzanas, moras, fresas, frambuesas, uvas, pasas, naranjas, limones, mandarinas, nueces y aceitunas) capaces de producir diferentes micotoxinas. Debido a su estructura química, las micotoxinas producidas por *Alternaria* se pueden dividir en: i) dibenzo- α -pironas (alternariol (AOH), alternariol metil éter (AME) y altenuene (ALT)), ii) ácido tetrámico: ácido tenuazonico (TeA), iii) quinonas perilenas (altertoxinas I-III ATX I-III), iv) toxinas *alternata* (AAL-TA1, AAL-TA2, AAL-TB1, AAL-TB2); v) otras estructuras como los tetrapéptidos cíclicos: Tentoxina (TEN) [4]. La estructura química de algunas de estas micotoxinas se recoge en la Figura 1.

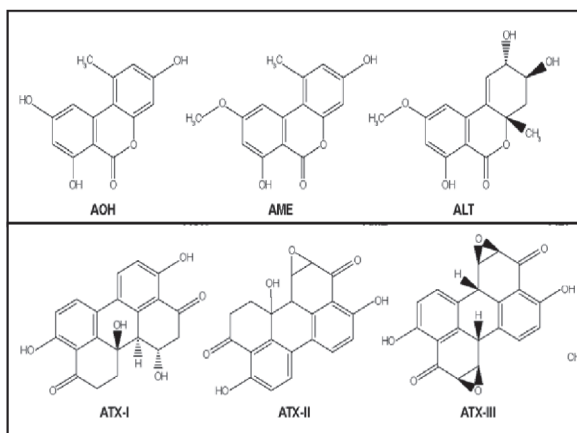
* e-mail: ana.juan@uv.es

Tabla 1. Micotoxinas principales y hongo productor (modificado de [4]).

| Micotoxina | Acrónimo | Hongo |
|----------------------------|------------------------|---|
| Aflatoxinas B1, B2, G1, G2 | AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 | <i>Aspergillus flavi</i> |
| Alternariol | AOH | <i>Alternaria alternata</i> |
| Alternariol monometil eter | AME | <i>A. alternata</i> , <i>A. solani</i> |
| Ácido tenuazonico | TeA | <i>A. alternata</i> |
| Altetoxinas (I-III) | ATX (I-III) | <i>A. tenuissima</i> |
| Altenuene | ALT | <i>A. alternata</i> |
| Ocratoxina A | OTA | <i>Aspergillus circumdati</i> , <i>A. nigri</i> , <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. nordicum</i> |
| Fumonisinias B1, B2 | FB1, FB2 | <i>Fusarium liseola</i> |
| Deoxinivalenol | DON | <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> |
| Zearalcona | ZEN | <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. incarnatum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. verticillioides</i> |

Tabla 2. Principales micotoxinas presentes en alimentos y sus efectos tóxicos (modificado de [2]).

| Micotoxina | Efectos tóxicos | Mecanismos de acción celulares y moleculares |
|--------------------------------|---|--|
| Aflatoxina | Hepatotoxicidad Genotoxicidad Inmunomodulación | Formación de aductos con ADN Peroxidación lipídica Bioactivación del Cit-P ₄₅₀ ; Formación de glucuronatos |
| Ocratoxin A | Nefrototoxicidad Genotoxicidad Inmunomodulación | Efecto en la síntesis de proteínas Inhibición en la producción de ATP Detoxificación por peptidasas |
| Patulina | Nefrototoxicidad Mutagénesis (<i>in vitro</i>) | Inhibición enzimática indirecta |
| Tricotecenos (Toxina T-2, DON) | Hepatotoxicidad Inmunomodulación Toxicidad en piel | Efecto en la síntesis proteínas Inducción de apoptosis en células progenitoras hematopoyéticas y células inmunitarias Alteraciones de las inmunoglobulinas |
| Zearalenona | Fertilidad y reproducción | Unión a receptores de estrógenos; Bioactivación por reductasas; Formación de glucuronatos |
| Fumonisinina B1 | Daño en el sistema nervioso central Hepatotoxicidad Genotoxicidad Inmunomodulación | Inhibición de la síntesis de ceramida Alteración del ratio esfingalina/csfingosina Alteración del ciclo celular |

**Figura 1.** Estructura de las principales micotoxinas producidas por *Alternaria*: i) dibenzo- α -pironas (alternariol (AOH), alternariol metil éter (AME) y altenuene (ALT)), ii) ácido tetrámico: ácido tenuazonico (TeA), iii) quinonas perilenas (altetoxinas I-III ATX I-III)

Es frecuente encontrar los ingredientes principales para la elaboración de alimentos así como el propio alimento, contaminados con más de una especie de hongo o con más de una micotoxina. La importancia de la co-presencia de micotoxinas reside en las alteraciones de los efectos tóxicos que se pueden producir en la combinación de estas, con respecto a la toxicidad de las micotoxinas individuales; ya que se han descrito efectos de sinergismo, adición y/o antagonismo [1-13].

Con el fin de evaluar el riesgo tóxico de compuestos en humanos se deben aplicar diferentes estudios de toxicidad en animales. Sin embargo, debido al número de animales necesarios y por motivos éticos y científicos, se han establecido modelos *in vitro* que permiten trabajar con cultivos celulares y obtener datos de efectos tóxicos del compuesto ensayado.

Los datos que recoge la bibliografía de las micotoxinas de *Alternaria* reflejan la capacidad que tienen para producir efectos tóxicos tanto agudos como crónicos. Concretamente para la micotoxina AOH, se cree que tiene propiedades carcinógenas y mutágenas, aunque hasta la fecha no se han llevado a cabo ensayos *in vivo* [14], tampoco hay

datos de absorción, distribución y excreción [15]; sin embargo, tras la realización de ensayos *in vitro* se ha visto que AOH se hidroxila fácilmente con el ácido glucurónico y el sulfato dando lugar a metabolitos conjugados; que es un potente genotóxico, citotóxico, que altera la proliferación celular y las cadenas de ADN, entre otras. Dada la ausencia de legislación para AOH y la toxicidad que recogen los estudios científicos, se hace necesaria la recopilación de todos los efectos tóxicos conocidos hasta la actualidad. Para ello, se ha realizado una búsqueda bibliográfica de los artículos de AOH disponible en bases de datos como: Pubmed, Scopus, Science Direct y Current Contents en los últimos catorce años. El objetivo de la siguiente revisión bibliográfica es evaluar los efectos de AOH recogidos de ensayos *in vitro*.

Ensayos *in vitro* con alternariol

El número de estudios *in vitro* llevados a cabo con AOH en líneas celulares es escaso. A continuación se muestran las líneas celulares sobre las que se han desarrollado ensayos *in vitro* con AOH.

1 Células de adenocarcinoma de colon: HT-29 y Caco-2

La composición del epitelio intestinal y las interacciones de los diferentes tipos de células *in vivo* presentan características complejas. Las líneas celulares intestinales humanas Caco-2 y HT-29 aisladas de adenocarcinoma de colon humano, son las más utilizadas en ensayos *in vitro* para estudios de adhesión y de procesos de transporte epitelial [16,17]. La línea celular Caco-2 forma monocapas polarizadas en cultivos celulares y se diferencia a células muy similares a los enterocitos del epitelio intestinal [18,19]. Las células HT-29 de morfología epitelial, no están diferenciadas, son heterogéneas y contienen una proporción muy pequeña (i.e. < 5%) de células secretoras de mucosa y de enterocitos (células de las microvellosidades) y por tanto pueden obtenerse poblaciones diferenciadas bajo condiciones específicas de estrés metabólico [20].

Las células Caco-2 son las más utilizadas y las más caracterizada aunque presenta algunas limitaciones y/o ventajas según el compuesto a estudiar y por lo tanto condicionan el estudio de toxicidad que se vaya a llevar a cabo, como son: i) baja permeabilidad para compuestos hidrofílicos que atravesarían el epitelio por vía acuosa, debido a la uniformidad que presenta la monocapa lo que la hace más parecida a células de colon que a tejido intestinal; ii) están constituidas únicamente de células de absorción, mientras que el epitelio intestinal está formado por una mezcla de enterocitos y otras células como: caliciformes, endocrinas, células M,... siendo las células caliciformes el segundo tipo de célula más abundante (encargadas de producir la secreción de moco); iii) la sobre expresión de la P-glicoproteína (aunque en controversia), encargada de aumentar la secreción de moco y en consecuencia disminuir la permeabilidad para la absorción de sustancias; y iv) permeabilidad reducida para aquellos compuestos que se absorben mediados por un transportador, lo que pone de manifiesto el origen colónico de esta línea celular.

2 Células de pulmón de hámster chino: V79

La línea celular V79 fue desarrollada por Ford and Yerganian en 1958 desde tejido pulmonar de hámster chino (macho).

Las células V79 han sido ampliamente utilizadas para estudios de mutagenicidad y de reparación del ADN. Son células inmortales, tiene un ciclo celular corto y mutan fácilmente dando lugar a líneas estables aunque deficientes en enzimas de reparación del ADN, y de las funciones relacionadas con la respuesta al daño del ADN. Las células V79 no expresan la proteína *p53* y no muestran la inducción

de la respuesta producida por el gen *MDM2* al daño del ADN. Todas estas propiedades ha hecho que sean células muy útiles para desarrollar determinados ensayos celulares, pero también han hecho plantear preguntas acerca de la generalización de los resultados que con ellas se obtienen. Tanto es así, que ensayos de mutagénesis y relacionados con daño y reparación del ADN llevados a cabo con estas células se aconseja que sean interpretados con cautela debido a la interrupción/alteración de las vías normales de respuesta al daño del ADN que presentan.

3 Células de adenocarcinoma hepático: HepG2

Los hepatocitos primarios y la línea de hepatocarcinoma, HepG2, son los modelos *in vitro* ideales para llevar a cabo estudios de reacciones de biotransformación que tienen lugar en el hígado; y son excelentes para estudios toxicológicos y farmacológicos. Mantiene tanto la morfología como las funciones específicas del hígado durante largos periodos de tiempo [21,22].

Son células fáciles de mantener y reproducen el sistema humano. Aunque son poco adecuadas para predecir/estudiar el metabolismo tal y como ocurre *in vivo* o en cultivos primarios, ya que la expresión de las enzimas encargadas de la metabolización de compuestos es distinta. Sin embargo, aunque las células HepG2 no tienen enzimas específicas del hígado, un aumento de la expresión de estas aumenta la sensibilidad genotóxica de las células HepG2. La mayoría de los autores describen la expresión del citocromo P-450, perteneciente a la ruta de metabolización del hígado de fase I, pero ignoran la expresión de enzimas pertenecientes a las de fase II, las cuales son importantes para las reacciones de detoxificación y activación de muchos xenobióticos [23].

4. Otras líneas celulares

A continuación se exponen características de líneas celulares sobre las que se han llevado a cabo ensayos de toxicidad del AOH en menor proporción, como son las células: MCF-7, A431, MLC, Ishikawa, H295R, HCT116, Hepa-1 y RAW 264.7.

Las células de cáncer de mama MCF-7, se caracterizan por tener abundante factor de transcripción *p53* (wild-type: mutaciones y cadenas cortas), el cual es capaz de activar determinados genes mediante la unión a secuencias de ADN específicas. Las topoisomerasas controlan, mantienen y modifican las estructuras y la topología del ADN durante los procesos de replicación y traslación del material genético mediante la formación de un complejo de topoisomerasa-ADN. La topoisomerasa I interacciona directamente con la proteína *p53* supresora de tumores de forma inespecífica (wild-type); esta interacción dependerá del estado en que se encuentre el factor *p53*, de hecho en las células MCF-7 la asociación/interacción está estrictamente condicionada con la estructura espacial y temporal que presente el factor *p53*, y solamente ocurre durante periodos muy cortos de estrés genotóxico [24,25]. Por otra parte las células de cáncer de piel (epidermis) A431 se caracterizan por tener factor *p53* no funcional y niveles elevados de receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que interfieren en el control de procesos de crecimiento, proliferación y apoptosis. Principalmente se utilizan para estudios de ciclo celular y para la señalización de rutas celulares de cáncer.

Ambos tipos de células, MCF-7 y A431 se han utilizado para estudiar la actividad de AOH sobre las topoisomerasas; bien para estudiar su efecto sobre la actividad catalítica (células MCF-7) o bien para estudiar la estabilidad del complejo topoisomerasa II-ADN (células A431).

Las células de linfoma de ratón (MLC) se utilizan para determinar el efecto mutagénico del AOH, con el estudio de la inducción de mutaciones en el locus de timidina kinasa (TK) de estas células. Las células Ishikawa se utilizan, para estudiar los efectos tóxicos sobre la reproducción, ya que estas células (de adenocarcinoma endometrial humano) contienen gran cantidad de receptores de estrógenos y de progestágenos. Las células de carcinoma adrenocortical humano H295R, se utilizan para ensayos de esteroidogénesis (disrupción endocrina), ya que contienen todas las enzimas implicadas en este proceso; además son capaces de producir hormonas esteroideas humanas y permiten evaluar alteraciones en la expresión génica y en la producción de esteroides sexuales. Las células para ensayos de genes de estrógenos RGAs inducibles de hormonas esteroideas, que se generan a partir de glándulas mamarias por inclusión de un gen de luciferasa [26]. Las células de carcinoma de colon HCT116, se han utilizado para estudios de efecto tóxico en intestino y la ruta de muerte celular, por ser la primera línea de contacto del tóxico tras una intoxicación alimentaria. Las células de cáncer hepático de ratón Hepa-1 se caracterizan por tener la ruta del AhR (receptor aril hidrocarburo) intacta (1c1c7) o deficiente (1c1c4 o 1c1c12) lo que les confiere diferente capacidad metabólica; por tanto se utilizan para estudios de metabolismo (glucuronación). Y las células de macrófagos de roedores murinos RAW 264.7, caracterizadas por tener una respuesta en el DNA funcional y la proteína p53, se han utilizado para estudios efectos en el ciclo celular a través de daños en el ADN.

Las líneas celulares en los efectos tóxicos de alternariol

Los efectos tóxicos producidos por AOH en las diferentes líneas celulares, así como el tipo ensayo, tiempo y dosis estudiada, se recogen en la tabla 3.

1. AOH en células Caco-2 y HT-29

Los ensayos llevados a cabo en células HT-29 para el estudio de los efectos producidos por AOH son muy diversos: proliferación celular, Western Blot, estrés oxidativo, glutatión, Cometa (lesión del ADN),...; y de igual modo la dosis, que va desde 0,1 a 100 μM ; y el tiempo de exposición: de 20 min a 24 h. Los efectos del AOH para este tipo de células se recogen a continuación. Tiessen y col, 2013 [27] recoge que: i) a concentraciones elevadas de AOH se reduce la proliferación celular, aumenta la actividad enzimática de GST y se incrementa el estrés oxidativo; coincidiendo con la sobreexpresión de tres genes relacionados con la respuesta antioxidante; mientras que ii) a las concentraciones y tiempos de exposición más bajos, los niveles de GSH disminuyeron llegando incluso a no ser detectables (Tabla 3).

En cuanto a la lesión del ADN, realizado con el ensayo Cometa, este sólo fue observable a concentraciones $\geq 1 \mu\text{M}$ y tiempo de exposición de 1h; resultados que coinciden con los publicados previamente en 2012 [28] con el mismo tipo de ensayo. Este daño se ha visto que está relacionado con la viabilidad celular, la cual se vio afectada principalmente a tiempos de exposición prolongados ($\geq 24\text{h}$); no obstante, a tiempos bajos de exposición (1h) ésta se mantiene con valores $>85\%$ y sin alteración de los niveles de la lactato deshidrogenasa (LDH) [29].

Recientemente Fernández-Blanco y col. [30] han estudiado los efectos que AOH produce en la proliferación celular, estrés oxidativo (especies reactivas de oxígeno (ROS) y lipoperoxidación lipídica (LPO)) y actividad enzimática (catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD)). Los resultados permiten concluir que a tiempos prolongados de exposición ($\geq 48 \text{ h}$) se produce una disminución del

número de células a medida que aumenta la concentración; mientras que a tiempos cortos de exposición (24 h) se produjo un aumento de ROS, LPO y de la actividad enzimática de SOD. La actividad de la CAT disminuyó a concentraciones $> 15 \mu\text{M}$.

Por otra parte, la generación de metabolitos tras la exposición a AOH se llevo a cabo tanto en células HT-29 [31] como en células Caco-2 [32]. Ambos estudios coinciden en que los metabolitos conjugados con ácido glucurónico (glucuronidación) son los más abundantes y los que se producen instantáneamente; incluso para la concentración y tiempo de exposición más bajo estudiado (20 μM durante 1 h). Las posiciones de conjugación por glucuronación del AOH se produjeron en los grupos hidroxilo del carbono 3 y 9, mientras que con sulfato se produjo el carbono 3. Por otra parte, se realizó un estudio de "liberación de AOH" desde el glucuronato generado mediante la adición simultánea de sulfato aril-beta-glucuronidasa, en células HT-29 observándose que la liberación de éste se producía en forma concentración dependiente [31] (Tabla 3). Así, la capacidad que posee AOH de producir daño celular se ve disminuida por la elevada capacidad que tanto las células HT-29 como las Caco-2 presentan para eliminar la micotoxina y los metabolitos generados a través de reacciones de glucuronidación.

Se estudió también el paso a través de la membranas apical o basal del AOH, simulada con la placas de Millicell®, y se observó que las formas conjugadas eran capaces de atravesar ambas membranas, mientras que la forma libre se acumula en el compartimento basolateral; concluyendo que la absorción a nivel intestinal de AOH era rápida y amplia [32].

2. AOH en células V79

En las células V79 principalmente se han llevado a cabo cuatro ensayos para el estudio de los efectos tóxicos producidos por AOH: daño al ADN, alteración del ciclo celular, genotoxicidad y mutagenicidad.

Los daños en las cadenas de ADN en las células V79 tras exposición a AOH durante tiempos cortos (1h) se produjo en forma concentración dependiente [31,33]. Teniendo en cuenta que estas células no presentan enzimas y por tanto no producen reacciones de metabolización (hidroxilación y de glucuronidación), no se generan metabolitos [31] y en consecuencia la alteración de la viabilidad celular se debe únicamente al AOH en concentraciones elevadas ($\geq 30 \mu\text{M}$) [34] (Tabla 3).

Tras el estudio de la distribución del ciclo celular, se observó una alteración de las fases del ciclo tras la exposición a AOH, mostrándose una acumulación de células en la fase G2/M de forma concentración dependiente (32% a 10 μM y 62.6% a 30 μM) [33-35]. Esta acumulación también se observó en la fase S a medida que aumenta el tiempo de exposición; hecho que se asoció a la acumulación de células en la fase G2/M a tiempos inferiores [35].

La inducción de micronucleos (MN) se utilizó para estudios de genotoxicidad. Los resultados demostraron la capacidad genotóxica de AOH mediante el aumento los MN en tiempo y concentración dependiente [35] (Tabla 3).

Brugger y col. [34] y Fleck y col. [33] estudiaron la capacidad de producir mutaciones en el gen del locus de la hypoxantina-guanina fosforiltransferasa (HPRT) tras varios periodos de exposición (1, 3 y 6 días). Los resultados demostraron que se producían mutaciones en los genes de este locus, concluyéndose que el AOH tiene actividad mutagénica [33,34].

Tabla 3. Línea celular, dosis, tiempo de exposición, ensayo y efecto obtenido en ensayos in vitro llevados a cabo con la micotoxina Alternariol (AOH).

| Línea celular | Dosis Tiempo de exposición | Ensayo | Efecto | Ref. |
|-----------------------|---|--|---|------|
| HT-29 | 0,1-50 µM a) 24 h b) 3 h c) 1 h d) 20 min, 1 y 3 h e) 1 y 24 h f) 1 y 3 h | A) SRB (a) B) Proliferación celular (WST-1) (b) C) DCF (c) D) Western Blot (contenido de Nrf2) (d) E) RT- PCR (Nrf2/ARE para tres genes) (b) F) GSH/GSSG (e) G) Actividad de GST (e) H) Cometa (f) A) Cometa (c) B) DCF (c) | A) A 50 µM de AOII se produjo una reducción de las proteínas celulares (10-15%). B) La actividad mitocondrial no se vio afectada. C) AOH produjo estrés oxidativo (5,5 veces más que el control) D) A los 20 min: no hubo efecto A 1 y 3 h: AOII aumento los niveles de la proteína nuclear Nrf2 E) AOH produjo aumento de tres genes (GSTA1, GSTA2 y γGCL) de forma concentración-dependiente F) A 1 h: los niveles de GSH total disminuyeron a 10 y 50 µM G) A 1 h: AOH no afectó la actividad de la GST A 24 h: AOH aumentó la actividad de GST (los niveles más altos a 50 µM) I) AOII no causa daño en el ADN | [27] |
| | | A) AOH posee acción moderada sobre la rotura de las cadenas de ADN. B) AOH aumentó 2,5 veces la señal de DCF a 50 µM | [28] | |
| Caco-2 | a) 20 µmol/L 1, 2 y 3 h b) 10, 20, 30, 40 µmol/L 2 h a) 3, 125-100 µM 24, 48 y 72 h b) 15, 30 y 60 µM 24 h c) 15, 30 y 60 µM 120 min | A) Detección de metabolitos (a) B) Absorción con placas de 24-pocillos Millicell® plates (medidas a intervalos de 30 min) (b) A) Citotoxicidad (a): -MTT, -RN, -CP B) IPO (b) C) Especies reactivas de oxígeno intracelulares (H ₂ -DCFDA); (e) D) Actividad de la SOD; (b) E) Actividad de la CAT; (b) | A) Glucuronidación de AOII en el grupo hidroxilo del C-3 y C-9; conjugación con sulfato en el grupo hidroxilo del C-3 B) Las formas conjugadas de AOH atravesaron las membranas apical y basal; el AOH libre alcanzó el compartimento basolateral. A) AOH redujo el número de células a las 48 y 72 h para los ensayos de MTT, RN y CP, alcanzando máximos de 40, 30 y 45% respectivamente. B) AOH aumentó el MDA en forma concentración-dependiente, siendo el máximo a 60 µM (250%) C) AOII produjo aumento de las ROS a todas las concentraciones ensayadas; el cual fue más notable a tiempos más bajos que a altos (de 1,4 veces) D) AOH aumentó la actividad de la SOD con la concentración (93% para 60 µM) E) AOII disminuyó la actividad de la CAT a concentraciones >15 µM (53% a 30 µM). | [32] |
| | | A) Viabilidad y citotoxicidad (a): -Azul de Tripán y -LDII B) Cometa (b) C) Ensayo alcalino con Hoechst 33258 (1 µM) como ligando de unión (c) | A) La viabilidad celular (>85%) se mantuvo a lo largo de todo el ensayo. AOH no afectó la liberación de LDII. B) AOH (≥1 µM) produjo un aumento de la rotura de las cadenas de ADN tras 1 h de tratamiento C) AOH muestra un valor de EC ₅₀ de 8,1±1,2 µM | [29] |
| A431 | 0-100 µM 1 h | Ensayo de depleción de inmunobanda | AOII afecta a las topoisomerasas celulares, especialmente a la isoforma Top.IIα | [29] |
| V79 | 0-20 µM a) 24 h b) 1,5 h | A) Ensayo de HPRT (1, 3 y 6 días) (a) B) Ciclo celular (CyStain DNA Protein 2, Partec) (a) C) Ensayo alcalino con Hoechst 33258 (b) | A) AOII produce un aumento dependiente de la concentración en la frecuencia de mutaciones B) AOH afecta al ciclo celular y produce acumulación de células en la fase G2/M (32%, 10 µM). C) AOH produjo rotura de las cadenas de ADN | [33] |
| V79 HT-29 HepG2 | a) 1-50 µM 1 y 24 h b) 1-25 µM 24 h | A) Ensayo alcalino con Hoechst 33258 (a) B) Conjugación de AOH (a) (detección de metabolitos) C) Actividad de glucuronidación específicamente con 2 mM de UDPGA (b) | A) A 1 h: aumentó la rotura de las cadenas de ADN de forma concentración-dependiente (de 5 a 50 µM). A 24 h: sólo en las células HepG2 aumentó la rotura de las cadenas de ADN. B) Las células HT-29: -produjeron reacción de conjugación (glucuronidación), mientras que un 75% de las HepG2 no lo hicieron (a 1 y 24 h) -fueron mucho más activas en la conversión de AOH conjugado que las HepG2 -aumentaron el AOH libre cuando se trataron con β-glucuronidasa/aryl sulfato en forma concentración-dependiente. C) Las células HT-29 tienen mucha mayor actividad de reacción de glucuronidación que las otras líneas celulares estudiadas. | [31] |
| V79 MLC | 0-30 µM 24 h | A) Citotoxicidad B) Ensayo de HPRT (1, 3 y 6 días en células V79) Ensayo TK (1, 2 y 3 días, en células MLC) C) Ciclo celular (CyStain DNA Protein 2, Partec) | A) Disminución de la viabilidad celular en forma concentración-dependiente a concentraciones ≥30 µM (V79, 35%) o 20 µM (MLC, 69%). B) AOH produjo mutaciones en el locus HPRT (células V79) y en el locus TK (células MLC). C) Aumento de las células en la fase G2/M en forma concentración-dependiente, tanto en las células V79 (62,6%; 30 µM) como en las MLC (37,1%; 20 µM). | [34] |
| Ishikawa V79 | Células Ishikawa: 0-10 µM a) 48 y 72 h b) 48 h Células V79: 0-50 µM c) 6 h d) 6, 14 y 24 h | Ensayo de estrogenicidad: A) ALP (con y sin: E2 o ICI182.780). Medida cada 10 min durante 1 h. (sólo en células Ishikawa); (a) B) RT- PCR (para mRNA de la expresión de ALP) (sólo en células Ishikawa); (a) C) Proliferación y distribución del ciclo celular (CyStain DNA Protein 2, Partec); (a y c) Ensayos de genotoxicidad D) Inducción de MN: MN neg. y MN pos. (DAPI: 1 µg/mL). (b y d) | A) AOH induce ALP con una EC ₅₀ =2,7±1,7 µM; 10.000-veces más débil que E2; esta inducción se inhibió tras el tratamiento simultáneo con ICI182.780. No se observó una reducción de ALP tras el tratamiento simultáneo con 10 nM de E2. B) Misma expresión de mRNA de ALP para el tratamiento con AOH o con E2; mientras que esta se inhibió con el tratamiento simultáneo de AOII con ICI182.780. C) La proliferación de las células Ishikawa disminuyó de 48 a 72 h (50%) tras el tratamiento con AOH. Estos efectos se correlacionaron con los efectos observados en el ciclo celular. Para las células V79 no se observaron modificaciones en la proliferación celular ni a las concentraciones más elevadas (25 y 50 µM). En cuanto al ciclo celular, el tratamiento con AOH produjo una disminución de células en la fase G1/G0 de forma concentración-dependiente y un aumento en la fase S y G2/M debido a la acumulación de células en G2 en los dos tipos de células. D) En las células Ishikawa, AOII aumentó la suma total de MN neg. + MN pos. a las concentraciones más altas estudiadas; mientras que en las células V79, este aumento se obtuvo de forma tiempo y concentración-dependiente. AOH disminuyó la actividad de ALP debido a una disminución de la proliferación celular. | [35] |

| | | | | |
|------------------------|--|--|--|------|
| MCF-7 | 0-200 μM 1 h | D) Topoisomerasa I - Ensayo de relajación - Ensayo de ruptura F) Topoisomerasa II - Ensayo de decatenation - Ensayo de ruptura | D) AOH inhibe la actividad catalítica de la Top.I a 50 μM . AOH mejora la proporción de ADN plásmido circular en forma dependiente de la concentración. F) AOH inhibe la actividad catalítica de -Top.II α a conc. $\geq 25 \mu\text{M}$ -Top.II β a conc. $\geq 100 \mu\text{M}$ AOH estabiliza: Top.II α -ADN intermediario a conc. $\geq 10 \mu\text{M}$ Top.II β -ADN intermediario a conc. $\geq 50 \mu\text{M}$ AOH tiene menor efecto sobre Top.II β | [29] |
| H295R RGAs* | a) 0,1-1000 ng/mL b) 50-10000 ng/mL c) 25-5000 ng/mL 24 y 48 h d) 3,87 μM a 48 h | A) Citotoxicidad: - Alamar Blue (células H295R) (a) - MTT (células RGAs) (b) B) Esteroidogénesis - Test agonista (b) - Ensayo genético – Test antagonista (c) C) Producción de hormonas (a) : progesterona, estradiol, testosterona y cortisol D) RT-qPCR - expresión genética (d) | A) La viabilidad de las células H295R no varió a las concentraciones estudiadas; mientras que para las células RGAs se produjo a las concentraciones más altas estudiadas. B) AOH produjo un efecto agonista a las concentraciones más altas, probablemente relacionado con el efecto citotóxico. AOH produjo un efecto de sinergismo en la unión de la progesterona al receptor progestágeno. C) AOH aumentó la producción de progesterona y estradiol. D) AOH fue capaz de regular la expresión de los genes analizados. | [35] |

ARE: elementos de respuesta antioxidante; Nrf-2: factor-2 nuclear; SRB: ensayo de sulforodamina B; HPRT: hipoxantina-guanina fosforiltransferasa; RT-PCR: PCR tiempo real; MLC: células de linfoma de ratón L5178Y tk⁺/-; TK: timidina quinasa; ALP: ensayo de las fosfatasas alcalinas; E2: 17 β -estradiol marcado radiactivamente (inductor de ALP); ICI182.780: receptor antagonista estrogénico de elevada afinidad; MN: micronúcleos; MN neg.: micronúcleos negativos; fragmentos de cromosomas acéntricos; MN pos.: micronúcleos positivos; cromosomas enteros; I1295R: carcinoma adenocarcinoma humano; *RGAs: líneas celulares para ensayos de genes de estrógenos; MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-bromuro de difenil tetrazolium; RN: rojo neutro; CP: contenido de proteínas; LPO: lipoperoxidación lipídica; SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; MDA: malondialdehído.

3. AOH en células HepG2

Actualmente, un único artículo recoge la capacidad del AOH para producir alteraciones/daño en las cadenas de ADN de las células HepG2 [31]. Estos autores observaron que las células HepG2 tienen una mayor sensibilidad a la alteración de las cadenas de DNA que la que producen otras líneas celulares como HT-29 o V79. Además ofrecen mayor resistencia a producir reacción de conjugación incluso a tiempos de exposición prolongados (24h); probablemente debido a la inespecificidad enzimática que esta células poseen (Tabla 3).

4. Efectos de AOH en otras líneas celulares

Con el fin de estudiar si los efectos de AOH sobre las cadenas de ADN están relacionados con interferencias en la actividad catalítica de las topoisomerasas I y II (Top. I y Top. II con sus isoformas: Top.II α y Top.II β), se llevo a cabo un estudio sobre las células MCF-7 [29]. Los resultados demostraron que AOH inhibe la actividad catalítica de ambas topoisomerasas, aunque este efecto era más acusado para la Top. I (conc. $\geq 50 \mu\text{M}$) que para las Top.II (α y β) y para la Top. II α más que para la Top. II β . Estos resultados se corroboraron mediante un ensayo de depleción de inmunobanda con Western Blot de las topoisomerasas en células A431 [29].

El efecto mutagénico y sobre la reproducción del AOH se ha llevado a cabo con células MCL y Ishikawa. El AOH demostró que en células MCL tiene actividad mutagénica sobre el locus TK a dosis $\geq 10 \mu\text{M}$ y tiempos de exposición $\geq 24\text{h}$: estos efectos se relacionaron con la alteración en la distribución del ciclo celular, ya que se produjo un aumento de células en la fase G₂/M del ciclo con el aumento de la concentración (37% para 20 μM) (Brugger y col., 2006). Sobre la reproducción, se observó una disminución de la proliferación de las células Ishikawa desde las 48 a las 72h de exposición, que estuvo correlacionado con las alteraciones observadas en la distribución del ciclo celular; la proporción de células en la fase G₁/G₀ que disminuyó con el aumento de la concentración, mientras que la proporción de células en la fase S y G₂/M aumentaron [35].

Los efectos de citotoxicidad por AOH en las células RGAs sólo se produjeron a las concentraciones más altas ($\geq 2500 \text{ ng/mL}$), mientras que este efecto no se observó para las H295R. En los ensayos de esteroidogénesis, para las mismas condiciones y para los dos tipos de

células, AOH produjo un efecto agonista y de sinergismo con la progesterona, aumentó la producción de hormonas (progesterona y estradiol) y aumento la expresión génica de aquellos genes implicados en la esteroidogénesis [36].

Los estudios sobre la ruta de muerte celular de AOH con células HCT116 muestran que esta se produce por apoptosis dependiente de la actividad de la caspasa-9, en forma dosis dependiente, a través de la apertura de los PTP, y produciendo indirectamente la activación y despolarización del MMP [37]. La producción de ROS por AOH se asoció a las alteraciones mitocondriales provocadas por AOH, mientras que la sobreexpresión de p53 y aumento de la actividad de la caspasa-3 se debió a la apoptosis producida por AOH. Por otra parte, el ensayo de AOH con células HCT116-Bax-KO, deficientes en la proteína pro-apoptótica Bax, refleja la capacidad protectora de esta proteína en las alteraciones mitocondriales producidas por AOH [37].

Estudios de metabolización con diferentes tipos de células Hepa-1 (Hepa-1c1c4, Hepa-1c1c7, Hepa-1c1c12) tras la exposición a AOH demuestran que la actividad enzimática de Cit-P450 disminuye [38]. Por otra parte, el metabolito mayoritario (no oxidativo) detectado fue el 4-hidroxilado de AOH aunque sólo en las células Hepa-1c1c12. La actividad enzimática más baja de la catecol-O-metiltransferasa se obtuvo en las células Hepa-1c1c7, mientras que la más alta, para la UDP-glucuronosiltransferasa, en las células Hepa-1c1c4. En general se observó que las formas conjugadas de AOH aumentan con el aumento del tiempo de exposición. Y por último, el ciclo celular de estas líneas celulares tratadas con AOH se detuvo en la fase G₂/M, aunque sólo para las células Hepa-1c1c7 y Hepa-1c1c12 [38].

Los efectos tóxicos del AOH sobre el ciclo celular a través de daños en el ADN se han estudiado en las células RAW 264.7. Los resultados revelan que a dosis bajas (15 y 30 μM) se reducía la proliferación celular, mientras que a dosis altas (60 μM) se producía muerte celular por necrosis con aumento de las células en la fase G₂/M para todas las dosis y tiempos ensayados, efectos que coincidieron con la de otros autores. Se observó también un aumento de ROS, lo que produjo en consecuencia despolarización del MMP así como un aumento en las proteínas involucradas en la reparación y generación del ADN (histona H2AX fosforilada, Chk-1 y Chk-2) [39]. En un estudio posterior llevado a cabo por el mismo grupo de autores, se

estudiaron alteraciones implicadas en el efecto de AOH en el ciclo celular y que se van produciendo en los diferentes estadios de afectación del ciclo celular [40]. Así se ensayaron los efectos en la fluidez de membrana, se determinaron proteínas intracelulares (Histona H3 como marcador mitótico y el complejo ciclina B-cdc2) y gangliósidos implicados en la organización de las bases lipídicas (GM1). Los resultados demostraron que tras la exposición a AOH las células mitóticas disminuyeron, los niveles de proteínas implicadas en el complejo ciclina B-cdc2 aumentaron, al igual que la fluidez de la membrana [40].

Conclusiones

Los ensayos *in vitro* recogidos en la bibliografía con la micotoxina AOH ponen de manifiesto la capacidad que tiene de producir reducción en la proliferación y viabilidad celular, aumento de la actividad enzimática de GST y SOD, disminución de la actividad de la CAT, acumulación de ROS, inducción de LPO, generación de metabolitos conjugados con ácido glucurónico, detención del ciclo celular en la fase S, lo que produce una acumulación en la fase G2/M, inhibición catalítica de las topoisomerasas, daños en el ADN, aumento de la esteroidogenesis y capacidad genotóxica y mutagénica.

En resumen, los resultados obtenidos revelan la capacidad de AOH de provocar efectos tóxicos a corto y largo plazo, y por tanto la especial atención que hay que poner a esta micotoxina, así como la necesidad de legislar sus niveles en alimentos. Por otra parte, dada la presencia simultánea de sustancias tóxicas en un alimento, el planteamiento de futuros ensayos *in vitro* relacionados con la acción del AOH debería de ir encaminado al estudio de la alteración de estos efectos tóxicos mediante combinaciones dobles, triples o cuádruples de micotoxinas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (AGL2013-43194-P)

Bibliografía

- Juan-García A, Manyes L, Ruiz MJ, Font G (2013) Applications of flow cytometry to toxicological mycotoxin effects in cultured mammalian cells: A review. *Food Chem Toxicol* 56:40-59.
- Debongnie P (2009). Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01.
- Ashiq S, Hussain M, Ahmad B (2014) Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants: A review. *Fungal Genet Biol* 66:1-10.
- Marin S, Ramos A, Cano-Sancho G, Sanchis V (2013) Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol* 60:218-237.
- Juan C, Mañes J, Raiola A, Ritieni A (2013) Evaluation of beauvericin and enniatins in Italian cereal products and multicereal food by liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chem* 140:755-762.
- Juan C, Ritieni A, Mañes J (2012) Determination of trichothecenes and zearalenones in grain cereal, flour and bread by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem* 134:2389-2397.
- Fernandez-Pinto V (2008) Detection and determination of *Alternaria* mycotoxins in fruits and vegetables. In: Mycotoxins in fruits and vegetables. Barkai-Golan R. and Nachman P. (eds.), Academic Press, San Diego, CA, USA, 271-278.
- Rasmussen R, Storm I, Rasmussen P, Smedsgaard J, Nielsen K (2010) Multi-mycotoxin analysis of maize silage by LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 397:765-776.
- Reglamento de la Comisión Europea (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Official Journal L* 364.
- Reglamento de la Comisión Europea (EC) No 1126/2007 of 28 September 2007 amending Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards Fusarium toxins in maize and maize products. *Official Journal L* 255/14.
- Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, Tabuc C, Nicolau A, Aprodu I, Puel O, Oswald I (2012) Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed - Focus on Europe. *Toxins* 4:788-809.
- Ruiz M, Macáková P, Juan-García A and Font G (2011) Cytotoxic effects of mycotoxin combinations in mammalian kidney cells. *Food Chem Toxicol* 49:2718-2724.
- Tatay E, Meca G, Font G, Ruiz MJ (2014) Interactive effects of zearalenone and its metabolites on cytotoxicity and metabolism in ovarian CHO-K1 cells. *Toxicol Vitro* 28:95-103.
- Magan N, Olsen M. (2004) *Mycotoxins in food*. 1st ed. Boca Raton, FL (USA): CRC Press.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2011) Scientific opinion on the risks for animal and public health related to the presence of *Alternaria* toxins in feed and food. *EFSA Journal* 9 10:2407.
- Cencic A, Langerholc T (2010) Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology - A review. *Int J Food Microbiol* 141:S4-S14. extracellular matrix geometry: long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB J* 3:174-177.
- Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E, Louvard D (2011) Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and function. In: Teriung, R.L., Williams, J.A. (Eds.), *Comprehensive Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology, Intestinal Absorption and Secretion*. American Physiological Society, Bethesda, USA 223-255.
- Pinto M, Robine-Léon S, Appay MD, Keding M, Triadou N, Dussaulx E, Lacroix B, Simon-Assmann P, Haffen K, et al., (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47:323-330.
- Rousset M, (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two *in vitro* models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68:1035-1040.
- Huet G, Kim I, de Bolos C, Lo-Guidice JM, Moreau O, Hermon B, Richet C, Delannoy P, Real FX (1995) Characterization of mucins and proteoglycans synthesized by a mucin-secreting HT-29 cell subpopulation. *J Cell Sci* 108:1275-1285.

21. Dunn JC, Yarmush ML, Koebe HG, and Tompkins RG (1989) Hepatocyte function and extracellular-matrix geometry- long-term culture in a sandwich configuration. *FASEB Journal* 3:174-177.
22. Bader A, Rinkes IH, Closs EI, Ryan CM, Toner M, Cunningham JM, Tompkins RG, and Yarmush ML (1992) A stable long-term hepatocyte culture system for studies of physiologic processes: cytokine stimulation of the acute phase response in rat and human hepatocytes. *Biotechnol Prog* 8:219-225.
23. Cantelli-Forti G, Hrelia P, and Paolini M (1998) The pitfall of detoxifying enzymes. *Mutat Res* 402:179-183.
24. Gobert C, Skladanowski A, Larsen AK (1999) The interaction between *p53* and DNA topoisomerase I is regulated differently in cells with wild-type and mutant *p53* *Proc Natl Acad Sci USA* Vol. 96:10355-10360.
25. Bielawski A, Winnicka K, Bielawska A (2006) Inhibition of DNA Topoisomerases I and II, and Growth Inhibition of Breast Cancer MCF-7 Cells by Ouabain, Digoxin and Proscillaridin. *A Biol Pharm Bull* 29:1493-1497.
26. Hecker M, Newsted JL, Murphy MB, Higley EB, Jones PD, Wu R, Giesy JP (2006) Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid *in vitro* determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. *Toxicol Appl Pharmacol* 217:114-124.
27. Tiessen C, Fehr M, Schwarz C, Baechler S, Domnanich K, Böttler U, Pahlke G, Marko D, (2013) Modulation of the cellular redox status by the *Alternaria* toxins alternariol and alternariol monomethyl ether. *Toxicol Lett* 216:23-30.
28. Schwarz C, Kreutzer M, Marko D (2012a) Minor contribution of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid to the genotoxic properties of extracts from *Alternaria alternata* infested rice. *Toxicol Lett* 214:46-52.
29. Fehr M, Pahlke G, Fritz J, Christensen MO, Boege F, Altemöller M, Podlech J, Marko D, (2009) Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II α isoform. *Mol Nutr Food Res* 53, 441-451.
30. Fernández-Blanco C, Font G, Ruiz MJ (2014) Oxidative stress of alternariol in Caco-2 cells. *Toxicol Lett* 229:458-464.
31. Pfeiffer E, Eschbach S, Metzler M (2007) *Alternaria* Toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*. *Mycotoxin Research* 23:152-157.
32. Burkhardt B, Pfeiffer E, Metzler M (2009) Absorption and metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol-9-methyl ether in Caco-2 cells *in vitro*. *Mycotox Res* 25:149-157.
33. Fleck SC, Burkhardt B, Pfeiffer E, Metzler M (2012) *Alternaria* toxins: Altertoxin II is a much stronger mutagen and DNA strand breaking mycotoxin than alternariol and its methyl ether in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett* 214, 27-32.
34. Brugger EM, Wagner J, Schumacher DM, Koch K, Podlech J, Metzler M, Lehmann L (2006) Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol Lett* 164:221-230.
35. Lehmann L, Wagner J, Metzler M (2006) Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem Toxicol* 44:398-408.
36. Frizzell C, Ndossi D, Kalayou S, Eriksen GS, Verhaegen S, Sorlie M, Elliott CT, Ropstad E, Connolly L (2013) An *in vitro* investigation of endocrine disrupting effects of the mycotoxin alternariol. *Toxicol Appl Pharmacol* 271:64-71.
37. Bensassi F, Gallerne C, Sharaf El Dein O, Hajlaoui MR, Bacha H, Lemaire C (2012) Cell death induced by the *Alternaria* mycotoxin Alternariol. *Toxicol In Vitro* 26:915-23.
38. Burkhardt B, Jung SA, Pfeiffer E, Weiss C, Metzler M (2012) Mouse hepatoma cell lines differing in aryl hydrocarbon receptor-mediated signaling have different activities for glucuronidation. *Arch Toxicol* 86: 643-9.
39. Solhaug A, Vines LL, Ivanova L, Spilsberg B, Holme JA, Pestka J, Collins A, Eriksen GS (2012) Mechanism involved in alternariol-induced cell cycle arrest. *Mutat Res-Rev Mutat Res* 1-11.
40. Solhaug A, Holme JA, Haglund K, Dendele B, Sergent O, Pestka J, Lagadic-Gossmann D, Eriksen GS (2013) Alternariol induces abnormal nuclear morphology and cell cycle arrest in murine RAW 264.7 macrophages. *Toxicol Lett* 219: 8-17.