



VNIVERSITAT  
ID VALÈNCIA

**Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal**

Programa de Doctorat amb Menció cap a l'Excellència en  
Ciències de l'Alimentació

---

# **EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO POR EXPOSICIÓN A MICOTOXINAS Y EXTRACTO DE CALABAZA MEDIANTE TÉCNICAS ÓMICAS Y MOLECULARES**

## **TOXICOLOGICAL RISK ASSESSMENT OF MYCOTOXINS AND PUMPKIN EXTRACT EXPOSURE USING OMICS AND MOLECULAR TECHNIQUES**

---

**Tesi Doctoral Internacional València, juliol 2022**

**PRESENTADA PER:**

Manuel Alonso Garrido

**DIRIGIDA PER:** Dra. Guillermina Font Pérez | Dra. Lara Manyes i Font

VNIVERSITAT [ò\*]  
ID VALÈNCIA

**Facultat de Farmàcia**

Departament de Medicina Preventiva i  
Salut Pública, Ciències de l'Alimentació,  
Toxicologia i Medicina Legal



La **Dra. Guillermina Font-Pérez**, catedràtica de l'àrea de Toxicologia i la **Dra. Lara Manyes i Font**, Professora Titular de l'àrea de Nutrició i Bromatologia,

## CERTIFIQUEN QUE:

El graduat en Ciència i Tecnologia dels Aliments **D. Manuel Alonso Garrido** ha realitzat baix la seua direcció el treball "**Evaluación del riesgo toxicológico por exposición a micotoxinas y extracto de calabaza mediante técnicas ómicas y moleculares**", i autoritzen la seua presentació per a optar al títol de Doctor per la Universitat de València.

I, perquè així conste, expedeixen i signen el present certificat.

Burjassot (València), Juliol 2022.

Dra. Guillermina Font Pérez

Dra. Lara Manyes i Font

Aquest treball ha sigut plasmat en 5 articles publicats o que es publicaran en les següents revistes:

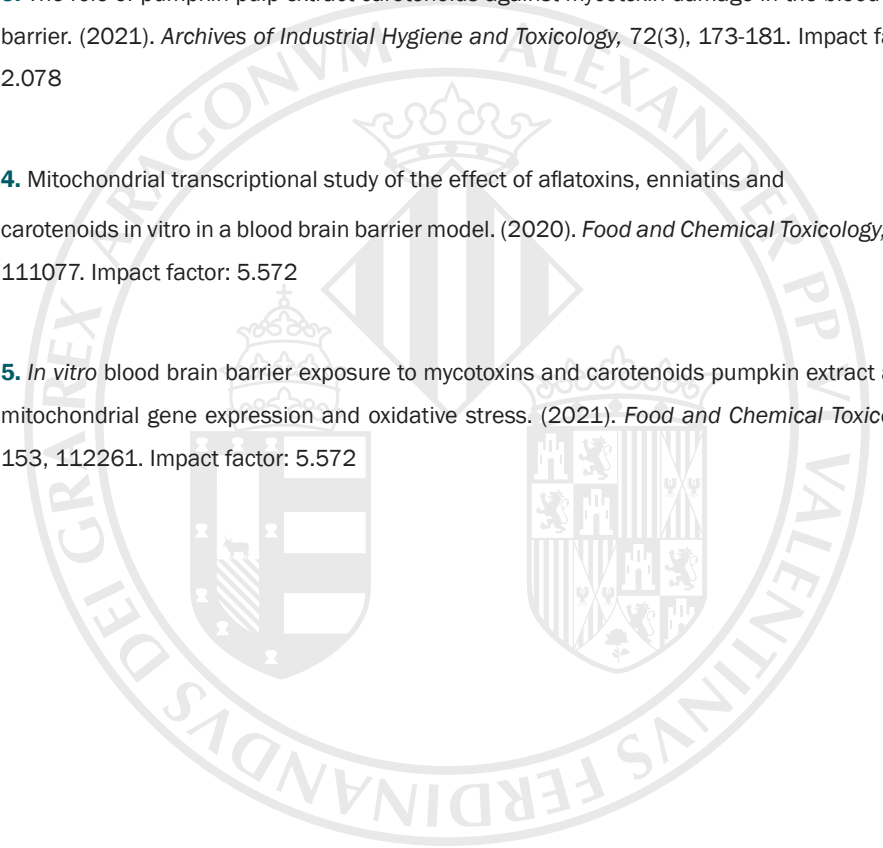
**1.** Assessment of Single Nucleotide Variant discovery protocols in RNA-seq data from human cells exposed to mycotoxins. Under revision. *Toxicology Mechanisms and Methods*. Impact factor: 4.019

**2.** Mitochondrial proteomics profile points oxidative phosphorylation as main target for beauvericin and enniatin B mixture. (2020). *Food and Chemical Toxicology*, 141, 111432. Impact factor: 5.572

**3.** The role of pumpkin pulp extract carotenoids against mycotoxin damage in the blood brain barrier. (2021). *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 72(3), 173-181. Impact factor: 2.078

**4.** Mitochondrial transcriptional study of the effect of aflatoxins, enniatins and carotenoids in vitro in a blood brain barrier model. (2020). *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111077. Impact factor: 5.572

**5.** *In vitro* blood brain barrier exposure to mycotoxins and carotenoids pumpkin extract alters mitochondrial gene expression and oxidative stress. (2021). *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112261. Impact factor: 5.572



El doctorando Manuel Alonso Garrido agradece al Ministerio de Ciencia e Innovación el contrato de investigación para la formación de doctores (BES-2017-081328).

Esta tesis doctoral se engloba dentro de los siguientes proyectos:

- Programa PROMETEU para grupos de investigación de excelencia (PROMETEU 2018/126). Generalitat Valenciana, Conselleria d'Educació, Investigació, Cultura i Esport.
- Mitigación, Biomarcadores y Toxicidad de Micotoxinas Legisladadas y Emergentes (AGL2016-77610-R). Ministerio de Economía y Competitividad.
- Biopreservación de pan de molde con suero de leche fermentado frente a micotoxinas y hongos toxigénicos. Seguridad de uso en presencia de carotenoides (SAFE BIOBREAD) (PID2019-108070RB-I00-ALI). Ministerio de Ciencia e Innovación.



El doctorando Manuel Alonso Garrido agradece a MEDFUTURE y a la Iuliu Hatieganu University of Medicine and Pharmacy (Rumanía) las estancias disfrutadas. .



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
**IULIU HAȚIEGANU**  
CLUJ-NAPOCA

---

El doctorando Manuel Alonso Garrido agradece al Ministerio de Ciencia e Innovación la Ayuda de Movilidad para la mención Internacional del título de Doctor que se realizó en el Institute of Molecular Physiology, Microbiology and Wine Research, Johannes Gutenberg University of Mainz (Alemania), bajo la dirección del Dr. Eckhard Thines.



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

---

Manuel Alonso Garrido agradece también a la ayuda de movilidad del FORTHEM European project (612489-EPP-1-2019-1-DEEPPKA2-EUR-UNIV).



Doctorarse es una tarea larga y exigente. Un camino empinado y sinuoso en el que los retos que vas superando proporcionan una satisfacción enorme y las experiencias vividas te hacen crecer.

Todo esto sería imposible sin un gran equipo como el que he tenido la suerte de formar parte, en el que mis directoras han sido fundamentales. Gracias Lara por tu capacidad de trabajo, pasión por la ciencia y perseverancia. Siempre recordaré todo lo que hemos compartido. Guillermina, muchísimas gracias por tu generosidad. Por haberme acogido y cuidado desde el primer momento hasta el último y por ser una grandísima científica. No hubiera podido desear tener una mejor mentora.

Jordi, muchas gracias por tu apoyo incondicional, por tu esfuerzo y estar siempre disponible. La pasión con la que vives la ciencia es un ejemplo. Endavant Vila-real!

Gracias a mis compañeros y compañeras. No podría estar más contento del equipo que hemos formado. Especialmente a Ale y a Massimo, mis dos italianos del sur favoritos. Siete veramente grandi, ragazzi.

Gracias Alfonso por las chapas que nos damos en las comidas y por ser un apoyo incondicional. Gracias también a Peppe, Laura, Pepi, Yelko, Raquel, Tiago, María José, Houda, Juan Carlos, Mónica, Pilar, Carlos, Juanma, Raquel, Luna, Mercedes y al resto de investigadores y profesores del departamento y estudiantes con los que he tenido la suerte de compartir momentos.

Gracias a Carmen, Amparo y al resto del personal de administración por su amabilidad y predisposición. Sin vosotros las gestiones serían imposibles. También a Marga, Rut, Juani y Sandra por facilitarme tanto el trabajo en prácticas.

Gracias a Ricardo, por acompañarme en nuestro momentos de evasión en la Calderona.

Gracias al Market, mi refugio en Valencia. Javi, Itxaso, Susana, Paola, Dani, Amparo, Juanjo y Rosa las risas compartidas y las confianzas han hecho estos años mucho más divertidos. Por muchos más.

Charros y charras, sois muchos y mucho. Desde el Santa Catalina, pasando por la Juve, el Zona, el Rastro y Puerto de Béjar y ese gran regalo que es Unionistas construido entre todos. Soy como soy en gran parte por vosotros.

Berta, haberte conocido ha sido algo que no me esperaba. No te imaginas la suerte que he tenido de haberte encontrado. A tu lado todo es muchísimo mejor.

Familia, por muchos años de seguir juntándonos. Saber que estáis ahí siempre es algo que no tiene comparación. Muchas gracias por todo el apoyo que me habéis dado y por sentirnos siempre tan cerca.

Abuela, sé que te hubiera encantado verme aquí. Te llevo muy dentro.

Isa, eres mi hermana favorita. Muchas gracias por tu cariño, inteligencia y consejos. Daniel y Sergio, vuestra alegría es mi felicidad y veros crecer es un regalo. Alberto, gracias por el buen humor y nuestras conversaciones.

Mamá y Papá, no hay nada que pueda escribir aquí que pueda reflejar lo que os quiero. Muchas gracias por dárme todo. Sois mi ejemplo en la vida. Os admiro desde lo más hondo.

Salud,

Manu

---

**ÍNDICE**  
**INDEX**

---



LIST OF TABLES ..... XX  
 LIST OF FIGURES ..... XXII  
 LIST OF ABBREVIATIONS ..... XXIV  
 RESUMEN ..... 01  
 SUMMARY ..... 03

1. INTRODUCCIÓN ..... 05  
 1.1. Aspectos generales sobre micotoxinas ..... 07  
 1.2. Micotoxinas legisladas ..... 08  
 1.2.1. Aflatoxinas ..... 08  
 1.2.2. Ocratoxina A ..... 09  
 1.2.3. Zearalenona ..... 09  
 1.3. Micotoxinas no legisladas ..... 10  
 1.3.1. Beauvericina ..... 10  
 1.3.2. Eniatinas ..... 10  
 1.4. Las ómicas en las ciencias de la alimentación ..... 11  
 1.4.1. Estudios transcriptómicos de exposición a micotoxinas ..... 12  
 1.4.2. Estudios proteómicos de exposición a micotoxinas ..... 20  
 1.4.3. Estudios metabolómicos de exposición a micotoxinas ..... 25  
 1.5. Efectos neurotóxicos por exposición a micotoxinas y mitigación mediante el uso de carotenoides ..... 31

2. OBJETIVOS ..... 43  
 2. OBJECTIVES ..... 45

3. MATERIALS AND METHODS ..... 46  
 3.1. Transcriptomics ..... 47  
 3.1.1. Raw RNA-seq data acquisition ..... 47  
 3.1.2. Variant calling on RNA-seq data ..... 47  
 3.1.2.1. Pre-processing raw RNA-seq data ..... 47  
 3.1.3. Single nucleotide variant (SNV)-RNA-seq complementary pipeline ..... 48  
 3.1.4. Genome Analysis Tool Kit Best Practices workflow ..... 48  
 3.1.5. SNVs discovery assessing ..... 49  
 3.1.6. Comparison of two transcriptomic protocols ..... 49  
 3.2. Proteomics ..... 49  
 3.2.1. Reagents ..... 49  
 3.2.2. Cell culture and mycotoxins exposure ..... 50  
 3.2.3. Mitochondria enriched extracts ..... 51  
 3.2.4. Sample preparation for proteomics ..... 51  
 3.2.5. Preparation of peptide extracts for quantitative proteomics ..... 51  
 3.2.6. Label-free mass spectrometry and data analysis ..... 52  
 3.2.7. Protein functional analysis ..... 52  
 3.3. Metabolomics ..... 53  
 3.3.1. Reagents ..... 53  
 3.3.2. Cell culture ..... 53  
 3.3.3. Monolayer integrity checks ..... 54  
 3.3.4. Blood Brain Barrier exposure experiment ..... 55  
 3.4. Differential Gene Expression analysis of mitochondrial genes after mycotoxins exposure with and without pumpkin extract .... 56  
 3.4.1. Reagents ..... 56  
 3.4.2. Cell culture ..... 57

3.4.3. Primer design and Quantitative Real-Time PCR assays.....	59
3.4.4. Intracellular ROS generation .....	61
<b>4. RESULTS.....</b>	<b>62</b>
4.1. Assessment of Single Nucleotide Variant in RNA-seq data from human cells exposed to BEA and ENs mixture .....	63
4.1.1. Variant calling on RNA-seq data .....	63
4.1.2. SNVs discovery assessing.....	64
4.1.3. Transcriptomic study with the new protocols .....	64
4.2. Mitochondrial proteomics profile points to oxidative phosphorylation as the main target for beauvericin and enniatin B mixture.....	67
4.2.1. Proteomics analysis.....	67
4.2.2. Transcriptional Vs. proteomic profile of Jurkat cells exposed to BEA and ENB ...	71
4.3. The role of pumpkin extract against mycotoxin damage in the blood brain barrier in vitro: metabolomic approach .....	72
4.3.1. Differential analysis of metabolites abundances.....	72
4.3.2. Reactome findings.....	77
4.4. <i>In vitro</i> blood brain barrier exposure to mycotoxins and carotenoids pumpkin extract: transcriptional approach .....	78
4.4.1. Effect of aflatoxins, enniatins and carotenoids on gene expression .....	78
4.4.1.1. Complex I.....	79
4.4.1.2. Complex IV .....	80
4.4.1.3. Complex V .....	81
4.4.1.4. Mitochondrially encoded 16S rRNA .....	82
4.4.1.5. Nuclear encoded mitochondrial genes .....	83
4.4.1.6. Pathvisio analysis .....	84

4.4.2. Effects of beauvericine, enniatins, ochratoxin A and zearalenone on gene expression .....	85
4.4.3. Effects of beauvericine, enniatins, ochratoxin A and zearalenone on intracellular ROS generation .....	91

## 5. DISCUSIÓN.....95

5.1. Análisis bioinformático sobre datos de secuenciación de ARN de células Jurkat expuestas a BEA y ENB. ....	96
5.2. Análisis proteómico sobre el efecto en la mitocondria de la exposición a BEA y ENB en células Jurkat .....	98
5.3. Análisis metabolómico sobre la exposición de micotoxinas y extracto de calabaza a un modelo de barrera hematoencefálica in vitro .....	101
5.4. Efecto de la exposición a micotoxinas y extracto de calabaza en la producción de ROS y la expresión génica mitocondrial en células ECV304.....	103
5.4.1. Efecto protector del extracto de calabaza frente a la acción de las micotoxinas sobre la CTE .....	103
5.4.2. Efecto protector del extracto de calabaza frente a la acción de las micotoxinas sobre genes del sistema mitocondrial codificados en el núcleo .....	105

## 6. CONCLUSIONES.....107

## 7. REFERENCES .....110

## LIST OF TABLES

### 1. INTRODUCCIÓN

<b>Tabla 1.</b> Relación de estudios transcriptómicos realizados sobre micotoxinas .....	18
<b>Tabla 2.</b> Relación de estudios proteómicos realizados sobre micotoxinas.....	24
<b>Tabla 3.</b> Relación de estudios metabolómicos realizados sobre micotoxinas .....	29
<b>Tabla 4.</b> Relación de estudios de neurotoxicidad de exposición a micotoxinas .....	37

### 2. MATERIALS AND METHODS

<b>Table 5.</b> Relation between mycotoxin food contamination levels and plasma concentration (Devreese et al., 2013) .....	50
<b>Table 6.</b> HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS absolute quantification of carotenoids in <i>C. Maxima</i> (Delica).....	57
<b>Table 7.</b> ECV304 differentiated cells exposure conditions using 0.1% DMSO in HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution .....	58
<b>Table 8.</b> Primers for RT-qPCR analysis. *Housekeeping gene .....	60

### 3. RESULTS

<b>Table 9.</b> Differentially expressed genes with $\log_{2}FC >  1 $ in at least one dose in ENB exposed samples and coincident with former studies. FDR: false discovery rate; $\log_{2}FC$ : fold change logarithm .....	66
<b>Table 10.</b> Functional annotation chart of the 5 most significant terms using DAVID resources of the 340 proteins selected after BEA:EN B exposure in the categories Uniprot keyword, Uniprot sequence feature and KEGG .....	68
<b>Table 11.</b> PANTHER's GO-slim results using 340 proteins selected after BEA:EN B exposure by Fisher's Exact ( $p$ value $< 0.05$ ) test type, false discovery rate (FDR) as correction, fold enrichment $> 10$ .....	70

**Table 12.**  $\log_{2}FC$  values of metabolites with significantly changed quantity ( $p < 0.05$ ) compared to respective controls (control containing vehicle or vehicle + pumpkin extract (P)) found in the basal media after 2-hour exposure to mycotoxins (100 nmol/L each) with or without pumpkin (500 nmol/L beta-carotene equivalent) .....

**Table 13.** Pathways overlapped in all conditions by PathVisio ( $p < 0.05$ ) .....

**Table 14.** RT-qPCR  $\log_{2}FC$  values of gene expression relative quantification comparing to the control. Bold numbers  $p < 0.05$ ; C, control. P, pumpkin. BEA, beauvericin. EN, enniatins. OTA, ochratoxin A. ZEA, zearalenone .....

## LIST OF FIGURES

### 1. INTRODUCCIÓN

**Figura 1.** Esquema de las principales ciencias ómicas .....11

**Figura 2.** Principales efectos neurotóxicos inducidos por micotoxinas (modificado de Nguyen et al. 2021) .....42

### 2. MATERIALS AND METHODS

**Figure 3.** Workflow used to assess the metabolic profile of the blood-brain barrier model exposed to mycotoxins with and without pumpkin extract. BBB – blood brain barrier; LC-ESI-QTOF-MS – liquid chromatography-electrospray ionisation quantitative time of flight.....55

### 3. RESULTS

**Figure 4.** SNVs discovery by using two RNA-seq data processing protocols. First approach: SNV-protocol 1. Second approach: SNV-protocol 2. Red line: SNVs selected for experimental validation by real time PCR..... 64

**Figure 5.** A) Venn diagrams plotting the coincident DEGs considering each BEA exposure condition; B) Venn diagrams plotting the coincident DEGs considering each ENB exposure condition; C) Heat Map plotting the logFC of the most relevant DEGs found in ENB samples ( $\log_{2}FC > |1|$  and  $FDR < 0.05$ ) .....65

**Figure 6.** Venn diagrams of the number of significant metabolites ( $p < 0.05$ ) after 2-hour mycotoxin exposure (100 nmol/L per mycotoxin) without pumpkin extract (A) and with pumpkin extract (500 nmol/L) (B) .....72

**Figure 7.** a) Genes involved in the ETC pathway for Homo sapiens are shown: in green the down-regulated genes and in red the up-regulated for all conditions tested. b) Genes involved in the OXPHOS pathway for Homo sapiens are shown: in green the down-regulated genes and in red the up-regulated for all conditions tested .....78

**Figure 8.** Bar plot showing Cl genes relative expression when compared to control ( $\log_{2}RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_{2}RQ_{min}$  and  $\log_{2}RQ_{max}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  .....80

**Figure 9.** Bar plot showing CIV genes relative expression when compared to control ( $\log_{2}RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_{2}RQ_{min}$  and  $\log_{2}RQ_{max}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  .....81

**Figure 10.** Bar plot showing CV genes relative expression when compared to control ( $\log_{2}RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_{2}RQ_{min}$  and  $\log_{2}RQ_{max}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  .....82

**Figure 11.** Bar plot showing MT-RNR2 genes relative expression when compared to control ( $\log_{2}RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_{2}RQ_{min}$  and  $\log_{2}RQ_{max}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  .....83

**Figure 12.** Bar plot showing nuclear codified genes relative expression when compared to control ( $\log_{2}RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_{2}RQ_{min}$  and  $\log_{2}RQ_{max}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  ..... 84

**Figure 13.** H<sub>2</sub>-dichlorofluorescein diacetate probe analysis for Reactive Oxygen Species. R.U, relative units; P, pumpkin extract; Bea, Beuavericin; ENs, enniatins; OTA, ochratoxin A; Zearalenone, ZEA. Error bars, SD. o, outliers. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  .....92

## LIST OF ABBREVIATIONS

**BEA** Beauvericina

**FAO** Food and Agriculture Organization of the United Nations

**UE** Unión Europea

**AFs** Aflatoxinas

**OTA** Ocratoxina A

**DON** Deoxinivalenol

**FB1** Fumonisina B1

**ZEA** Zearalenona

**IARC** International Agency for Research in Cancer

**ENs** Eniáticas

**AFB1** Aflatoxina B1

**NADPH** Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**PAT** Patulina

**CIT** Citrinina

**ADN** Ácido desoxirribonucleico

**ARN** Ácido ribonucleico

**ROS** Especies reactivas de oxígeno

**RT-qPCR** PCR cuantitativa en tiempo real

**RNA-seq** Secuenciación de ARN de nueva generación

**SNV** Variantes de nucleótido único

**DEG** Gen diferencialmente expresado

**GO** Ontología genética

**CTE** Cadena de transporte de electrones

**LPS** Lipopolisacáridos

**DEP** Proteína expresada diferencialmente

**ATP** Adenosin trifosfato

**SOD** Superóxido dismutasa

**AFM1** Aflatoxina M1

**CI** Complejo I

**SNC** Sistema Nervioso Central

**CIV** Complejo IV

**CV** Complejo V

**CIII** Complejo III

**EP** Enfermedad de Parkinson

**GATK** Genome Analysis Toolkit

**GRCh38** Genome Reference Consortium Human Build 38 genome version

**VCF** Variant Call Format

**IGV** Integrative Genomic Viewer

**NGS** Next Generation Sequencing

**DAVID** Database for Annotation, Visualization and Integrated  
Discovery

**PANTHER** Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships

**DMSO** Dimethyl sulphoxide

**TEER** Transepithelial / transendothelial electrical resistance

**ECV304** Human umbilical vein endothelial

**TMEM263** Transmembrane protein 263

## RESUMEN SUMMARY

## RESUMEN

Las micotoxinas suponen un riesgo en seguridad alimentaria humana y animal ya que pueden contaminar una amplia gama de alimentos y piensos. El objetivo general de la tesis es la evaluación *in vitro* de los efectos tóxicos a nivel molecular producidos por micotoxinas y aportar información sobre sus mecanismos de acción.

Se comenzó con el estudio de las variantes de un solo nucleótido (SNVs) empleando datos transcriptómicos obtenidos por secuenciación masiva de ARN de células Jurkat expuestas individualmente a beauvericina (BEA) y enniatina B. Los dos protocolos de descubrimiento de SNVs mostraron resultados muy diferentes e incluso se encontraron SNVs manualmente. Los resultados de la expresión génica diferencial (DEGs) del análisis transcriptómico también se compararon con los obtenidos en estudios anteriores mostrando DEGs comparables pero no idénticos: sólo 2 DEGs superpuestos de BEA frente a los 43 DEGs publicados y 354 DEGs superpuestos de ENB, con 147 coincidencias respecto a los 245 DEGs encontrados en los resultados anteriores.

En el análisis proteómico de extractos de mitocondrias enriquecidos provenientes de células Jurkat expuestas durante 24 h a BEA:EN B, se identificaron y cuantificaron 340 proteínas (59 mitocondriales) alteradas de forma estadísticamente significativa. La exposición indujo cambios dependientes de la concentración en los niveles de proteínas mitocondriales que implican principalmente a los complejos de la membrana interna y externa, la cadena de transporte de electrones (CTE) y los ribosomas. Estos resultados señalaron daño en la fosforilación oxidativa, el metabolismo y las rutas de señalización relacionadas con enfermedades neurodegenerativas.

Algunas micotoxinas como BEA, ocratoxina A (OTA) y zearalenona (ZEA) pueden atravesar la barrera hematoencefálica (BHE). La acción antiinflamatoria de un extracto de calabaza procedente de la pulpa de *Cucurbitaceae maxima* (var. *Delica*) se analizó frente a estas micotoxinas y sus combinaciones (OTA+ZEA y OTA+ZEA+BEA) en un modelo de BHE con células ECV304 diferenciadas, tras dos horas de exposición. El metabolito proinflamatorio eoxina (14,15-LTE4) de la vía del ácido araquidónico mostró una menor abundancia en las muestras de ZEA y BEA+OTA+ZEA y extracto de calabaza que en las exposiciones a micotoxinas sin extracto de calabaza. Otro marcador de inflamación, el éster de prostaglandina D2-glicerol, sólo se encontró en los cultivos tratados con OTA+ZEA y BEA+OTA+ZEA, pero no en los que se incluía el extracto de calabaza. Además, la concentración del metabolito del extracto de calabaza dihidromorflavona disminuyó significativamente en presencia de micotoxinas. Por tanto, el extracto de calabaza mostró una actividad protectora contra la inflamación celular desencadenada por las micotoxinas.

Se estableció un enfoque transcripcional utilizando células ECV304 diferenciadas. Las micotoxinas elegidas fueron las aflatoxinas (AFs) y las ENs. Se utilizaron las mismas que concentraciones que en el estudio metabólico. Se analizó la expresión relativa de 13 genes relacionados con la mitocondria. Incluso a bajas concentraciones, la actividad del extracto de calabaza sobre la expresión de los genes mitocondriales provocó un efecto beneficioso y, para la mayoría de los genes estudiados a través de la CTE, desarrolló un efecto protector cuando se mezcló con AFs o ENs.

Se amplió el estudio transcripcional a la exposición de BEA, ENs, ZEA y OTA más extracto de calabaza, solas o combinadas. Estos genes relacionados con la CTE y la actividad mitocondrial se encontraron sobreexpresados en las exposiciones que incluían micotoxinas más extracto de calabaza frente a las de micotoxinas individuales. La exposición a BEA y BEA+ENs redujo significativamente la expresión génica del Complejo I y la adición de calabaza revirtió el efecto. El Complejo IV fue la estructura más regulada a nivel génico de la CTE para todas las condiciones. La generación intracelular de ROS fue dependiente de la condición y mostró una alta variabilidad. En conjunto, los datos confirman que los procesos mitocondriales en la BHE podrían verse comprometidos por la exposición a micotoxinas y el daño podría ser modulado por antioxidantes dietéticos como los carotenoides.

Se puede concluir que las técnicas ómicas suponen un cambio de paradigma en el estudio de riesgos toxicológicos de exposición a contaminantes, por lo que es necesario seguir profundizando en los conocimientos que aportan para aumentar la prevención redundando en una mayor seguridad alimentaria.

Palabras clave: carotenoides, *in vitro*, barrera hematoencefálica, RT-qPCR, inmunotoxicidad

## SUMMARY

Mycotoxins are a risk for food and feed safety as they can contaminate a wide range of these commodities. The overall objective of this work is to evaluate the toxic effects of mycotoxins *in vitro* at molecular level and to provide information on their mechanisms of action.

The analysis was started with the study of single nucleotide variants (SNVs) using transcriptomic data obtained by massive RNA sequencing of Jurkat cells individually exposed to beauvericin (BEA) and enniatin B (ENB) (1.5, 3 and 5  $\mu$ M). The two SNV discovery protocols showed very different results, some SNVs were found manually. The differential gene expression (DEGs) results of the transcriptomic analysis were also compared with those obtained in previous studies showing comparable but not identical DEGs: only 2 overlapping DEGs of BEA versus 43 published DEGs and 354 overlapping DEGs of ENB, with 147 matches with respect to the 245 DEGs found in the previous results.

In proteomic analysis of enriched mitochondria extracts from Jurkat cells exposed for 24 h to BEA:EN B (0.01-0.1-0.5  $\mu$ M), 340 proteins (59 mitochondrial) significantly statistical altered were identified and quantified. Exposure induced concentration-dependent changes in mitochondrial protein levels mainly involving the inner and outer membrane complexes, the electron transport chain (ETC) and ribosomes. These results pointed to damage in oxidative phosphorylation, metabolism and signaling pathways related to neurodegenerative diseases.

Some mycotoxins such as BEA, ochratoxin A (OTA) and zearalenone (ZEA) can cross the blood-brain barrier (BBB). The anti-inflammatory action of a pumpkin extract from *C. maxima* (var. Delica) pulp at 500 nmol beta-carotene/L was tested against these mycotoxins (100 nM) and their combinations (OTA+ZEA and OTA+ZEA+BEA) in a BBB model of differentiated ECV304 cells. After two hours of exposure, samples were analyzed with HPLC-ESI-QTOF-MS. Metabolites were identified with the Metlin database. The proinflammatory metabolite eoxin (14,15-LTE<sub>4</sub>) of the arachidonic acid pathway showed lower abundance in ZEA and BEA+OTA+ZEA and pumpkin extract samples than in mycotoxin exposures without pumpkin extract. Another marker of inflammation, prostaglandin D<sub>2</sub>-glycerol ester, was only found in cultures treated with OTA+ZEA and BEA+OTA+OTA+ZEA, but not in those including pumpkin extract. Furthermore, the concentration of the pumpkin extract metabolite dihydromorphlavone decreased significantly in the presence of mycotoxins. Therefore, pumpkin extract showed protective activity against cellular inflammation triggered by mycotoxins.

Next, a transcriptional approach was established using differentiated ECV304 cells. The mycotoxins chosen were aflatoxins (AFs) and ENs. The same concentrations as in the metabolomic study were used. The relative expression of 13 mitochondria-related genes was analyzed. Even at low concentrations, the activity of dietary carotenoids on mitochondrial gene expression elicited a beneficial effect as most of the genes studied through the CTE, developed a protective effect when mixed with AFs or ENs.

Subsequently, the transcriptional study was extended to BEA, ENs, ZEA, OTA and pumpkin extract exposure, individually and combined. The genes related to the CTE and mitochondrial activity were found to be overexpressed in exposures that included mycotoxins plus pumpkin extract versus only mycotoxins exposures. Exposure to BEA and BEA+ENs significantly reduced Complex I gene expression and the addition of pumpkin reversed the effect. Complex IV was the most up-regulated gene cluster structure at the CTE for all conditions. Intracellular ROS generation was condition dependent and showed high variability. Taken together, the data confirm that mitochondrial processes in the BBB could be compromised by mycotoxin exposure and the damage could be modulated by dietary antioxidants such as carotenoids.

In conclusion, omics techniques represent a paradigm shift in the study of toxicological risks exposure to contaminants, so it is key to further deepen the knowledge they provide to increase prevention resulting in greater food safety.

Keywords: carotenoids, in vitro, blood-brain barrier, RT-qPCR, immunotoxicity

A large, faint chemical structure is overlaid on the right side of the page. It features a central benzene ring with various substituents, including a long chain with a double bond and a hydroxyl group, and another chain with a double bond and a hydroxyl group. The structure is rendered in a light blue color against a dark teal background.

## INTRODUCCIÓN INTRODUCTION



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Aspectos generales sobre micotoxinas

La definición de micotoxina incluye cualquier metabolito tóxico para otros organismos producido por hongos. Los hongos pertenecen al filo Ascomycota, entre los que se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, principales productores de estos metabolitos secundarios nocivos. Las enfermedades que producen no involucran al hongo productor de las toxinas, tratándose de peligros abióticos de origen biótico (Marin et al., 2013).

La producción de micotoxinas está íntimamente relacionada con los factores ambientales que afectan al crecimiento y desarrollo de hongos toxigénicos como son la temperatura, la humedad, la actividad del agua, el pH y la concentración de oxígeno. Debido al cambio climático, la propagación de las micotoxinas se está generalizando a zonas anteriormente seguras y se han de extremar las precauciones en el almacenamiento de cereales y piensos (Zinedine & El Akhdari, 2021).

Hasta el momento se han determinado alrededor de 400 micotoxinas. Antes de 1985, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estimó que aproximadamente el 25 % de los cereales producidos en el mundo están contaminados por micotoxinas. Otras investigaciones han señalado que hasta el 79 % de las muestras de alimentos analizadas contenían micotoxinas (Eskola et al., 2020; Streit et al., 2013; Kovalsky et al., 2016).

La Unión Europea (UE), a través del reglamento (CE) N° 1881/2006, ha fijado límites máximos en productos alimenticios para determinadas micotoxinas: aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), citrinina (CIT), deoxivalenol (DON), fumonisina B1 (FB1), patulina (PAT) y zearalenona (ZEA). Esta legislación es de gran importancia para la prevenir la exposición en Europa, ya que durante las últimas décadas la globalización ha provocado grandes cambios en la cadena de producción alimentaria. Este modelo de producción y consumo, genera ingentes cantidades alimentos que son transportados de una parte a otra del mundo, planteando un desafío para la seguridad y el mantenimiento de la calidad. La monitorización de las micotoxinas en la seguridad e inocuidad alimentaria es fundamental, ya que pueden causar graves problemas toxicológicos y enormes pérdidas económicas a través de la contaminación de alimentos para consumo animal y humano (Gil et al., 2016).

Debido a los procesos de almacenamiento y transporte de los alimentos, junto a las contaminaciones originadas en el cultivo, las micotoxinas tienen graves implicaciones para la salud humana y animal incluso en concentraciones muy bajas. Ingeridas, pueden causar enfermedad aguda o crónica. Su toxicidad está relacionada con el metabolismo, mientras que la susceptibilidad de animales y humanos varía con la edad de la especie, la nutrición y otros factores (Pleadin et al., 2019). El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) inició un programa de Monografías en el que examinó la evidencia científica para evaluar el riesgo de exposición relacionado con micotoxinas. El estudio condujo a la clasificación de las AFs como carcinógenas para los humanos (grupo 1) y la FB1 y la OTA como probablemente carcinógenas (grupo 2B) (Ostry et al., 2017).

Por otro lado, existe un grupo de micotoxinas denominadas emergentes para las que no se han establecido límites máximos. Conforman un grupo de metabolitos de *Fusarium* caracterizados por no ser determinados de forma rutinaria, ni estar regulados legislativamente, pero para los que la evidencia de su toxicidad está aumentando rápidamente (Vaclavikova et al., 2013). Dentro de este grupo, las que más interés generan son la beauvericina (BEA) y las eniatinas (ENs) debido a su incidencia y toxicidad (Urbaniak et al., 2020).

## 1.2. Micotoxinas legisladas

### 1.2.1. Aflatoxinas

Las AFs son las micotoxinas más conocidas y estudiadas. Son compuestos policétidos sintetizados por una vía metabólica secundaria en los *Aspergilli*. Los dos principales productores de AFs son el hongo *A. flavus* y el *A. parasiticus*. *A. flavus* produce sólo AFs y en ocasiones la micotoxina ácido ciclopiazónico (CPA), mientras que *A. parasiticus* produce todas ellas (B1 y B2, G1 y G2), pero no CPA. Estas especies se han encontrado en una variedad de productos agrícolas, pero la contaminación más pronunciada se da en cultivos de cereales como el trigo, el maíz y los frutos secos. Las aflatoxinas M1 y M2 son metabolitos de la aflatoxina B1 que pueden aparecer en la leche y los productos lácteos (Xu et al., 2021).

Durante décadas, una gran variedad de investigaciones ha demostrado que son altamente genotóxicas, inmunosupresoras, mutagénicas y cancerígenas. Las aflatoxinas B1, B2, G1, G2 se han relacionado con el cáncer primario de hígado en humanos, siendo clasificadas por la IARC como carcinógenas en humanos en el Grupo 1 (Ostry et al., 2017). El mecanismo de acción de la AFB1, consiste en su metabolización en un epóxido de aflatoxina-8,9 por las enzimas citocromo

P450. Este derivado tiene la capacidad de reaccionar con el ADN, el ARN y las proteínas para formar aductos, especialmente con el gen supresor de tumores p53 (Dai et al., 2017). El AFB1-8,9-epóxido puede unirse al ADN formando predominantemente el aducto 8,9-dihidro-8(N7-guanil)-9-hidroxi-AFB1 (AFB1-N7-Gua) que sería el responsable de las propiedades carcinogénicas de la AFB1 (Coskun et al., 2018).

### 1.2.2. Ocratoxina A.

OTA es una micotoxina producida por los hongos *Aspergillus* y *Penicillium*. Se ha detectado en un gran número de alimentos y piensos como cereales, vino, café, cerveza, cacao, frutos secos, carne y especias (Heussner y Bingle, 2015). La evidencia del aumento de la incidencia de tumores hepatocelulares en ratones y de tumores de células renales en ratones y ratas, han llevado a la actualización de la clasificación de esta micotoxina por la IARC en el Grupo 2B (posiblemente cancerígeno para los humanos) (Ostry et al., 2017). Se ha demostrado que esta micotoxina es neurotóxica, nefrotóxica, teratogénica, inmunotóxica y citotóxica. Su mecanismo de toxicidad provoca el aumento de la actividad de las enzimas NADPH oxidasa y citocromo P450, activando la vía de señalización de la caspasa e induciendo la apoptosis. El estrés oxidativo inducido por la OTA en las mitocondrias y el retículo endoplásmico inhibe el ciclo celular y el metabolismo de lípidos y nucleótidos (Lee et al., 2019; Tao et al., 2018). La exposición a la OTA también provoca fetotoxicidad, lesiones renales y cambios en los parámetros hematológicos y morfológicos del riñón de ratas Fischer (Bondy et al., 2021).

### 1.2.3. Zearalenona

Los principales productores de ZEA pertenecen a especies de hongos del género *Fusarium*, como *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. semitectum* y *F. equiseti* (Rai et al., 2020). La estructura de la ZEA es similar a la de los estrógenos naturales como el estradiol, la estrona o el estriol (Gromadzka et al., 2008). La ZEA se ha detectado con frecuencia en diferentes cereales y productos derivados y en la leche de vacas (Mally et al., 2016; Coffey et al., 2009).

Hasta la fecha, se ha demostrado que es hepatotóxica, hematotóxica, citotóxica, genotóxica y puede causar toxicidad reproductiva y del desarrollo in vivo (Ropejko & Twaruzek, 2021). La ZEA también posee un efecto estrogénico, que se manifiesta clínicamente en el hiperestrogenismo, al transactivar los receptores de estrógeno y promover la expresión de los genes que responden al estradiol (Lecomte et al., 2017). Sin embargo, la carcinogenicidad de la ZEA sigue siendo cuestionable, ya que ha sido catalogada por la IARC como Grupo 3 (Rai et al., 2020).

### 1.3. Micotoxinas no legisladas

BEA y ENs son metabolitos secundarios sintetizados por varios hongos toxigénicos, entre ellos varias especies de *Fusarium* y ambas tienen una estructura química de hexadepsipéptidos cíclicos. Estos hongos son capaces de crecer en el maíz, el trigo, el arroz y otros productos básicos (Covarelli et al., 2015). Los niveles de contaminación observados en la cadena alimentaria demuestran que es necesario reducir las concentraciones de estas micotoxinas en los alimentos para garantizar la seguridad alimentaria de personas y animales. Los efectos toxicológicos atribuidos a la BEA y a las ENs han sido estudiados, principalmente en los últimos años (Mallebrera et al., 2018, 2016; Fraeyman et al., 2017; Prosperini et al., 2017). Recientemente, se ha confirmado la toxicidad y genotoxicidad de la BEA y las ENs in vivo en roedores (Maranghi et al., 2018). Sin embargo, todavía no se han dilucidado sus mecanismos de acción y respuestas tóxicas.

#### 1.3.1. Beauvericina

La BEA es un compuesto ionóforo que tiene la propiedad de aumentar la permeabilidad de los iones en las membranas biológicas al formar un complejo con cationes esenciales ( $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ), afectando así a la homeostasis iónica y desacoplando el proceso de fosforilación oxidativa (Kouri et al., 2003; Tonshin et al., 2010). Otros mecanismos de acción implican la inhibición de enzimas. Por ejemplo, la BEA es capaz de inhibir la acil-CoA colesterol aciltransferasa, una enzima que permite la producción de los ésteres de colesterol a partir del colesterol celular y los acil-CoA grasos de cadena larga. También se ha informado de su capacidad de inducir el estrés oxidativo con la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), seguida de una mayor peroxidación lipídica y una disminución del nivel de glutatión, probablemente afectando al sistema antioxidante. Como resultado de todas estas acciones, la BEA puede perturbar las concentraciones fisiológicas de iones intra y extracelulares e inducir la apoptosis en diversas líneas celulares (Caloni et al., 2020; Mallebrera et al., 2016).

#### 1.3.2. Eniatinas

La toxicidad de las ENs es similar a la de BEA y también se basa en sus propiedades ionóforas. Facilitan el transporte de cationes mono o divalentes como el  $K^{+}$  o el  $Ca^{2+}$  a través de las membranas, alterando así las concentraciones fisiológicas normales de estos iones (Gruber-Dorninger et al., 2017). Además, se ha demostrado que las ENs pueden inducir un efecto citotóxico mediante la producción de ROS y, posteriormente, provocar la peroxidación de lípidos y la alteración del ciclo celular normal debido a sus efectos necróticos y apoptóticos en varios modelos celulares (Prosperini et al., 2017). Además, pueden disminuir la capacidad de retención de calcio de la matriz de la mitocondria, lo que conduce al colapso del potencial de la membrana mitocondrial a través de la apertura del poro de transición de permeabilidad, y pueden causar el desacoplamiento de la

fosforilación oxidativa (Fraeyman et al., 2017). Estudios proteómicos realizados in vivo sobre ratas Wistar demostraron alteración de rutas biológicas claves para el funcionamiento celular a nivel proteómico, así como la alteración de la permeabilidad intestinal mediante disfunción mitocondrial e inducción de estrés oxidativo (Cimbalo et al., 2021a; Cimbalo et al., 2021b).

### 1.4. Las ómicas en las ciencias de la alimentación.

Las técnicas ómicas son una poderosa herramienta para analizar los procesos moleculares. Las investigaciones en el ámbito alimentario se han visto impulsadas mediante el uso de diferentes disciplinas ómicas como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica. Numerosos trabajos de investigación abordan el uso de diferentes tecnologías ómicas por separado o en combinación, no sólo en el análisis de los componentes de los alimentos, sino también en la autenticación de los mismos y en la evaluación de su seguridad y calidad (Balkir et al., 2021).

En la actualidad, todavía se desconoce la toxicología de la mayoría de las micotoxinas y formas derivadas a las que están expuestos los seres humanos y los animales. Los mecanismos de acción que subyacen a las acciones tóxicas conocidas aún no se comprenden del todo. Para ello, la toxicología de las micotoxinas debe investigarse desde una perspectiva holística. El primer paso en esta dirección puede ser el uso integrado de un enfoque multiómico para estudiar los eventos moleculares de manera integral y general (Fig. 1) (Dellaflora & Dall'Asta et al., 2017).

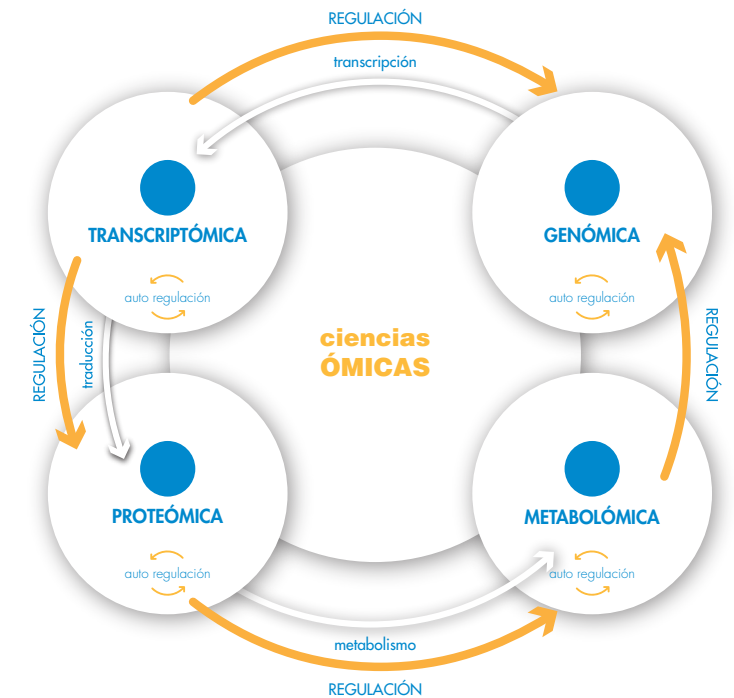


Figura 1. Esquema de las principales ciencias ómicas.

### 1.4.1. Estudios transcriptómicos de exposición a micotoxinas.

El transcriptoma se define como el conjunto completo de moléculas de ARN de un organismo. Se compone principalmente de ARN mensajero codificante, ARN ribosómico, ARN de transferencia y una gran variedad de ARN no codificante. En este contexto, los ARNm son de gran interés en los estudios biológicos, ya que representan el vínculo entre el genotipo y el fenotipo, por lo que son esenciales para comprender los elementos funcionales del genoma y los componentes moleculares de las células. A diferencia del genoma, que se caracteriza por su estabilidad, el transcriptoma de un organismo es dinámico ya que cambia en respuesta a una amplia gama de factores intrínsecos y extrínsecos. De hecho, el objetivo de la transcriptómica es identificar los genes que se expresan de forma diferencial en diferentes condiciones.

Existen esencialmente tres técnicas principales para abordar el transcriptoma: la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR), los microarrays y la secuenciación de ARN de nueva generación (RNA-seq). Para los estudios dirigidos a algunos genes específicos, la RT-qPCR es la tecnología de elección, ya que permite la detección de pequeñas diferencias en la expresión de los genes a través de las condiciones experimentales debido a sus propiedades cuantitativas. Para los estudios no dirigidos en los que se busca una visión holística, la tecnología de elección es la RNA-seq. Es un método no dirigido que nos permite secuenciar el ARNm íntegramente aportando una visión global de la expresión génica del organismo de estudio. Aunque los microarrays se consideran un método dirigido, permiten el estudio de casi todo el transcriptoma si se incluyen todos los genes conocidos en un microorganismo específico. Por tanto, esta tecnología permite a los investigadores obtener una visión global de los cambios en la expresión génica bajo un escenario experimental específico. Sin embargo, a diferencia de RNA-seq, los microarrays no tienen la capacidad de detectar nuevos transcritos (Lowe et al., 2017). En la tabla 1, se exponen todos los estudios realizados con la técnica RNA-seq para el análisis de la toxicidad de las micotoxinas investigadas en este trabajo.

Otra aplicación es la discriminación de variantes de nucleótido único (SNV) partiendo de los datos obtenidos mediante RNA-seq. El desarrollo de protocolos bioinformáticos se ha convertido en una de las técnicas más representativas debido a su alta precisión y rentabilidad. Las SNV son variaciones de base de un solo nucleótido, causadas por transiciones (C/T o G/A) o transversiones (C/G, C/A, o T/A, T/G), en la misma posición de secuencias individuales de ADN genómico. Los SNV se localizan en la región intergénica, en las secuencias codificantes de los genes (exones) o en las regiones no codificantes de los genes (intrones, 5'UTR, 3'UTR o sitios de unión exón-intrón). Las SNV que se producen en las regiones codificantes y en las secuencias reguladoras, pueden tener efectos sustanciales en la expresión de los genes y la función de las proteínas (Guo et al., 2019).

Existen cuatro ventajas principales para conducir el análisis de SNV utilizando los datos de RNA-seq: a) el descubrimiento de miles de SNV; b) cuantificar los niveles de expresión de genes funcionales con variaciones en la secuencia; c) se puede identificar la localización de las variaciones en las regiones codificantes asociadas a la exposición toxicológica y predecir los fenotipos en función de los genotipos; d) estos fenómenos se pueden observar simultáneamente por un coste razonable (Zhao et al., 2019). En esta tesis se expone el primer estudio bioinformático de discriminación de SNVs basado en RNA-seq en células expuestas a micotoxinas.

De todas formas, el análisis más extendido a partir de los transcritos adquiridos por RNA-seq es el de los genes diferencialmente expresados (DEGs). Esta técnica se ha usado para investigar los efectos subcrónicos de AFB1 en el transcriptoma del hígado de ratas macho F344/N. El análisis identificó 1.026 DEGs, siendo los más importantes los relacionados con las vías de señalización de Ahr, Nrf2, GSH, xenobióticos, ciclo celular, matriz extracelular y redes de diferenciación celular relacionadas con las vías que conducen a la carcinogénesis provocada por AFB1 (Tabla 1) (Merrick et al., 2013).

El estudio transcriptómico del hígado de patos comerciales Cherry Valley recién nacidos expuestos a AFB1 encontró 749 DEGs entre el control y el tratamiento con AFB1. Los resultados del análisis de las vías de origen genético (GO) y la base de datos genética KEGG mostraron que muchos genes implicados en el metabolismo de fase I, la desintoxicación de fase II, el proceso de oxidación-reducción, la carcinogénesis, la apoptosis y el ciclo celular, y el metabolismo de los ácidos grasos se vieron afectados por la exposición a esta micotoxina (Tabla 1) (Zhang et al., 2016).

Para aportar más información a los mecanismos de la hepatotoxicidad inducida por la AFB1, se seleccionaron las células LO2 cuya principal característica es estar detenidas en la fase S del ciclo celular. Utilizando RNA-seq de una sola célula y combinándola con secuenciación de bisulfito de representación reducida en una sola célula, se evidenció que la AFB1 alteró la regulación de la vía del receptor de la hormona liberadora de gonadotropina, la vía de señalización Wnt y la vía de señalización TGF-beta entre otras (Tabla 1) (Zhang et al., 2020).

El análisis transcriptómico de la exposición combinada a AFB1 y DON *in vitro* sobre células HepG2/C3A de hígado reveló diferentes DEGs. 215 genes se vieron sobreexpresados y 133 reprimidos para el tratamiento con DON, mientras que 268 genes fueron sobreexpresados y 26 reprimidos para el tratamiento con AFB1. El análisis transcriptómico de la combinación de ambas micotoxinas demostró una serie de genes expresados de forma única en su combinación, lo que indica una interacción sinérgica entre AFB1 y DON a nivel molecular. Se demostró que la vía JNK/

p38/MAPK asociada al estrés del retículo endoplásmico fue inducida por DON, mientras que la vía de señalización p53 fue activada por AFB1. Los perfiles de expresión de los genes relacionados con la apoptosis caspasa-3, Bax y Bcl-2 sugirieron una vía de apoptosis mediada por las mitocondrias que fue compartida entre AFB1 y DON. Por lo tanto, diferentes vías de citotoxicidad y su convergencia en el proceso apoptótico podría ser el mecanismo de la citotoxicidad aditiva/sinérgica de AFB1 y DON a las células HepG2/C3A (Tabla 1) (Li et al., 2017).

Examinando la toxicidad y los efectos de AFB1 y AFM1 en las células epiteliales mamarias bovinas, también se encontraron alteraciones a nivel transcriptómico. Los resultados de la RNA-seq mostraron que la AFB1 y la AFM1 perturbaron la expresión de genes relacionados como la apoptosis y el estrés oxidativo, el ciclo, la unión y la vía de señalización. Los resultados revelaron que existían varias alteraciones transcriptómicas a raíz del tratamiento con AFB1 y AFM1. En comparación con el control, se encontraron 418 y 335 DEGs, respectivamente. Los más importantes estaban implicados en las vías de apoptosis y estrés, ciclo celular, uniones estrechas y señalización celular (Tabla 1) (Wu et al., 2021).

Estudios realizados sobre el transcriptoma del hígado de embriones de pavos salvajes y domesticados expuestos a AFB1, identificaron 1535 DEGs. Los efectos de la AFB1 dependieron del tiempo de exposición y del tipo de pavo, siendo más tóxicos en los pavos domésticos lo que provocó una sobreexpresión de los genes reguladores del ciclo celular, los genes de respuesta mediada por NRF2 y los factores de coagulación (Monson et al., 2016). La evaluación *in vitro* de los cambios transcripcionales causados por la AFB1 en la línea celular derivada de hepatocitos fetales bovinos BFH12, afectó profundamente al transcriptoma celular, estando la mayoría de los DEGs asociados con el cáncer, el daño celular y la apoptosis, la inflamación, la bioactivación y las vías de desintoxicación (Pauletto et al., 2020).

La RNA-seq también se ha utilizado para dilucidar los mecanismos de acción sobre la inmunotoxicidad de la AFB1 en macrófagos ratón, encontrándose 83 DEGs. El análisis KEGG de la vía de la fosforilación oxidativa reveló sobreexpresión de 11 genes y represión de otros 14 genes relacionados con la cadena de transporte de electrones (CTE) en comparación con las células control. Además, se identificaron siete vías de regulación inmunitaria mediadas por el estrés oxidativo alteradas mediante este mismo análisis (Tabla 1) (Ma et al., 2021).

Estudios transcriptómicos realizados para dilucidar los mecanismos de acción en la nefrotoxicidad provocada por OTA en células epiteliales tubulares proximales derivadas de humanos (HK-2), identificaron 3193 genes expresados diferencialmente, 2224 sobreexpresados y 969 reprimidos. El análisis del transcriptoma reveló que la OTA afecta significativamente a la hipoxia, la transición epitelial-mesenquimal, la apoptosis y las vías del metabolismo de los xenobióticos en las células renales (Tabla 1) (Pyo et al., 2021).

El análisis por RNA-seq de los cambios moleculares producidos por la exposición a OTA en ovocitos y células de la granulosa que forman parte de los folículos en cerdos, reveló la alteración significativa de la vía PI3K/AKT demostrando una relación concreta entre esta ruta y la proliferación y apoptosis de las células de la granulosa (Tabla 1) (Zhang et al., 2019).

Un análisis transcriptómico *in vivo* del riñón de pollos sobre la exposición a OTA, reveló que los genes asociados con el metabolismo de los carbohidratos y los aminoácidos fueron reprimidos, y los genes asociados con el sistema inmunitario se encontraron sobreexpresados. Los genes asociados al metabolismo de los lípidos y a la biodegradación de los xenobióticos también sufrieron represión. Estos cambios desaparecieron el día 21, lo que sugiere que el riñón y otros órganos relacionados fueron reparados o el daño fue contenido (Tabla 1) (Zeferino et al., 2016).

Estudios realizados sobre células estromales del endometrio de ratón expuestas a ZEA identificaron 3.846 DEGs con respecto al grupo control y el grupo tratado con ZEA, siendo 1.810 y 2.036 los genes sobreexpresados y los reprimidos, respectivamente. Entre los DEGs, se encontraron numerosos genes relacionados con el ciclo celular, la apoptosis y el desarrollo embriológico (Tabla 1) (Xie et al., 2017).

Para explorar los efectos genotóxicos de la exposición a la ZEA en las células somáticas del ovario, se expusieron células de la granulosa porcina a dos dosis diferentes de ZEA durante 24 o 72 h *in vitro*. Los resultados mostraron que la exposición a la ZEA durante 24 h redujo notablemente la proliferación de las células de la granulosa porcina de forma dependiente de la dosis. La exposición a la ZEA durante 72 h indujo la apoptosis y el análisis RNA-seq confirmó que la expresión de los genes relacionados con la apoptosis estaba alterada. La RT-qPCR, la inmunofluorescencia y el análisis de western blot confirmaron que la expresión de los genes relacionados con el daño y la reparación del ADN ( $\gamma$ -H2AX, BRCA1, RAD51 y PRKDC), aumentó en las células de la granulosa expuestas a la ZEA. Al añadir al medio de cultivo tamoxifeno, antagonista de estrógenos, el

daño en el ADN y la reparación por la ZEA volvieron al nivel normal. En conjunto, estos resultados ilustran que la ZEA altera la estabilidad del genoma e inhibe el crecimiento de las células de la granulosa porcina a través de los receptores de estrógeno, lo que puede promover la apoptosis de las células de la granulosa cuando el sistema de reparación del ADN no es suficiente para rescatar este grave daño.

El análisis transcriptómico sobre células del sistema reproductivo (células de la granulosa) de ratón y cerdos expuestos a ZEA *in vitro*, aumentó la expresión de muchos genes relacionados con diferentes tipos de cáncer y vías relacionadas con el cáncer (Zhang et al., 2018a; Zhang et al., 2018b). Análisis del transcriptoma de células del intestino epitelial porcino (IPEC-J2) *in vitro* tras la exposición a ZEA identificó un total de 783 DEGs. El análisis KEGG de las rutas moleculares evidenció que las más alteradas fueron la vía PERK que regula la expresión génica, la vía de señalización de las cascadas de receptores tipo Toll, la mitosis, la metafase y la anafase mitóticas, la replicación del ADN y los puntos de control G2/M, estaban implicados en la vía del ciclo celular (Tabla 1) (Wang et al., 2019).

También se han realizado estudios *in vivo* sobre cerdas alimentadas con dietas que contenían ZEA en concentraciones de 0 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg y 10 mg/kg, respectivamente, de 8 a 14 días de gestación. El análisis del transcriptoma uterino reveló 75, 215 y 81 genes que se expresaron de forma diferencial en los tratamientos de 0 mg/kg frente a 1 mg/kg, 0 mg/kg frente a 10 mg/kg y 1 mg/kg frente a 10 mg/kg, respectivamente. El análisis de los términos GO mostró que los genes regulados al alza relacionados con el sistema inmunitario estaban muy expresados. El análisis de las vías KEGG reveló además la importancia de varias vías metabólicas, incluyendo el metabolismo de los fármacos-citocromo P450, la vía de interacción entre los receptores de citoquinas y las vías de señalización del calcio (Tabla 1) (Gao et al., 2022).

Estudios transcriptómicos *in vivo* realizados para evaluar la inmunotoxicidad de ZEA asociada a la implantación embrionaria en cerdas hembras, mostraron hasta 215 DEGs para la concentración más alta estudiada. El análisis de los términos GO mostró que los genes relacionados con el sistema inmunitario habían incrementado su expresión. El análisis de las vías KEGG reveló además la importancia de varias vías metabólicas, entre ellas la del metabolismo de los fármacos en el citocromo P450, la vía de interacción entre los receptores de citoquinas y las vías de señalización del calcio (Tabla 1) (Gao et al., 2022).

La RNA-seq sobre el transcriptoma de la placenta de ratas tratadas con ZEA *in vivo*, apuntó a que ZEA sería capaz de inhibir la expresión de proteínas transportadoras de nutrientes, incluyendo proteínas transportadoras de aminoácidos, proteínas transportadoras de esteroides, proteínas transportadoras de ácidos grasos, e interrumpir la biosíntesis normal de triglicéridos y el metabolismo de  $\beta$ -oxidación a las dosis y tiempos de exposición analizados. Asimismo, indujo autofagia mediante la inhibición de la vía de señalización AKT/m TOR mediada por ROS o/y la vía de señalización ERK/mTOR mediada por ROS en la placenta de rata (Tabla 1) (Pan et al., 2020).

Existen pocos estudios transcriptómicos sobre la acción tóxica de las micotoxinas BEA y ENB. De hecho, los únicos estudios desarrollados con esta técnica sobre células humanas, corresponden a nuestro grupo. El primero de ellos realizado sobre los mecanismos moleculares de la toxicidad de la BEA y la ENB mediante la secuenciación del transcriptoma en células Jurkat, evidenció que la exposición individual a cada una de ellas provocaba alteraciones en la transcripción de los genes mitocondriales con respecto al control. Al exponer las células a BEA, se encontraron 43 DEGs para las tres concentraciones estudiadas. Varios procesos biológicos relacionados con la CTE, la fosforilación oxidativa y la respiración celular se vieron significativamente alterados (Tabla 1) (Escrivá et al., 2018).

En el caso de la ENB, para las tres concentraciones estudiadas, se encontraron 245 DEGs. Los procesos biológicos relacionados con la ruta metabólica del monofosfato de nucleósido, los complejos de la CTE, la fosforilación oxidativa y la respiración celular fueron los más perturbados (Tabla 1) (Alonso-Garrido et al., 2018).

Recientemente, en otro estudio transcriptómico, se utilizaron como modelo hepatocitos primarios aislados de salmón del Atlántico (*Salmo salar*), exponiéndolos a diferentes concentraciones de BEA y ENB. Ambas micotoxinas mostraron citotoxicidad a concentración 5  $\mu$ M y superiores, provocando la condensación de los hepatocitos seguida de la formación de protuberancias tipo ampolla en la membrana de la célula. El análisis de secuenciación de ARN a niveles subcitotóxicos indicó que los hepatocitos expuestos a BEA y ENB experimentaron un mayor gasto energético, un elevado estrés oxidativo y alteraciones de la homeostasis del hierro que predispusieron a los hepatocitos a la ferroptosis (Tabla 1) (Søderstrøm et al., 2022).

Otro estudio realizado en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDC) de dos especies de ratones expuestos a BEA, también evidenció alteraciones transcriptómicas. Las células

fueron tratadas con BEA y lipopolisacáridos (LPS), individualmente y en combinación, para compararlas con un control sin tratamiento. El análisis de los principales componentes reveló que el tratamiento combinado de BEA con LPS se agrupa muy cerca del de la estimulación con BEA sola. Por otro lado, la expresión génica inducida por BEA es diferente de la estimulación con LPS. La estimulación combinada de BEA y LPS induce una expresión génica diferencial similar a la del tratamiento con BEA, compartiendo la regulación diferencial de la expresión génica relacionada con el endolisosoma, la expresión génica del metabolismo celular, la expresión génica mitocondrial, la expresión génica de la autofagia y la regulación de la transcripción. Estos resultados indican que BEA activa los BMDC a través de una vía de señalización dependiente de TLR4, pero induce un perfil de expresión génica diferente al de LPS (Tabla 1) (Yang et al., 2022, en prensa).

**Tabla 1.** Relación de estudios transcriptómicos realizados sobre micotoxinas.

MICOTOXINAS	MÉTODO DE ESTUDIO	MATRIZ BIOLÓGICA	DOSIS	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	TÉCNICA	PRINCIPALES EFECTOS	REFERENCIA
AFB1	In vivo	Hígado de patos recién nacidos	40 µg/Kg/día	14 días	RNA-seq	Hepatotoxicidad	Zhang et al., 2016
	In vivo	Hígado de ratas macho	1 mg/kg/day	90 días	RNA-seq / RT-qPCR	Carcinogénesis	Merrick et al., 2013
	In vitro	Línea celular humana LO2	20 - 40 - 60, 80 - 100, 120 - 160 - 180 - 200 µg/mL	24 h	single cell RNA-seq	parada de la fase S del ciclo celular	Zhang et al., 2020
	In vitro	Línea celular bovina BFH12	3,6 µM	48 h	RNA-seq	cáncer e inmunotoxicidad	Pauletto et al., 2020
	In vitro	Línea celular de ratón RAW264.7	50 µM	24 h	RNA-seq	estrés oxidativo y inmunotoxicidad	Ma et al., 2021
	OTA	In vivo	Riñón de pollo	1 mg/kg/día	21 días	RNA-seq	nefrotoxicidad
	Ex vivo	Células porcinas de la granulosa	20 - 40 µM	24 h	RNA-seq	Apoptosis e inhibición del crecimiento celular	Zhang et al., 2019

	In vitro	Línea celular humana HK-2	200 nM	48 h	RNA-seq / RT-qPCR	Nefrotoxicidad	Pyo et al., 2021
ZEA	In vivo	Útero de cerdas	1 - 2 - 10 mg/kg/día	8 - 14 días de gestación	RNA-seq / RT-qPCR	Inmunotoxicidad	Gao et al., 2022
	In vivo	Placenta de ratas dawley	2,5 - 5 - 10 - 20 mg/kg/día	7 días	RNA-seq / RT-qPCR	Disrupción de la función de la placenta	Pan et al., 2020
	Ex vivo	Células estromales de ratón	100 µM	24 h	RNA-seq	Hepatotoxicidad y neurotoxicidad	Xie et al., 2017
	Ex vivo	Células de la granulosa de ratón	10 - 30 µM	72 h	RNA-seq	Tumorigénesis	Zhang et al., 2018
	Ex vivo	Células de la granulosa de ratón y cerda	10 - 30 µM	72 h	RNA-seq / RT-qPCR	Tumorigénesis en ratón / inmunotoxicidad en cerdas	Zhang et al., 2018
	Ex vivo	Células de la granulosa de cerdas	10 - 30 µM	24 - 72 h	RNA-seq / RT-qPCR	Apoptosis / inestabilidad génica	Liu et al., 2018
	In vitro	Línea celular de cerdo IPEC-J2	40 µM	24 h	RNA-seq / RT-qPCR	Alteración del ciclo celular	Wang et al., 2019
BEA	In vitro	Línea celular humana Jurkat	1,5 - 3 - 5 µM	24 h	RNA-seq	Apoptosis y daño mitocondrial	Escrivá et al., 2018
	In vitro	Línea celular de ratón	5 µM	4 h	RNA-seq	Inmunotoxicidad por la vía de señalización dependiente de TLR-4	Yang et al., 2022

<b>ENB</b>	<i>In vitro</i>	Línea celular humana Jurkat	1,5 - 3 - 5 $\mu$ M	24 h	RNA-seq / RT-qPCR	Fosforilación oxidativa y respiración celular	Alonso-Garrido et al., 2018
<b>AFB1, DON</b>	<i>In vitro</i>	Línea celular humana HepG2/C3A	AFB1 2,5 mM / DON 0,56 mM	24 h	RNA-seq	Citotoxicidad y apoptosis	Li et al., 2017
<b>AFB1, AFM1</b>	<i>In vitro</i>	Línea celular bovina mamaria	AFB1 2 mg/L / AFM1 2 mg/L	24 h	RNA-seq	Alteración de la metilación del RNA	Wu et al., 2021
<b>AFM1, OTA</b>	<i>In vitro</i>	Línea celular Caco-2	AFM1 (4 $\mu$ g/mL) / OTA (4 $\mu$ g/mL)	48 h	RNA-seq / RT-qPCR	Inmunotoxicidad intestinal	Gao et al., 2020
<b>BEA, ENB</b>	Ex vivo	Hepato-citos de salmón	0,05 - 0,5 - 2,5 $\mu$ M	48 h	RNA-seq	Desacoplamiento mitocondrial y ferroptosis	Søderstrøm et al., 2022

### 1.4.2. Estudios proteómicos de exposición a micotoxinas

La proteómica es el estudio de la identificación y contenido total de proteínas codificadas por el genoma expresadas bajo las condiciones de estudio. Las tecnologías desarrolladas hasta la fecha permiten la descripción estructural de las proteínas, su identificación y cuantificación, incluyendo sus isoformas, y las interacciones entre ellas formando complejos de orden superior (Piñeiro et al., 2015).

Estas tecnologías están basadas en la espectrofotometría de masas que se empezó a popularizar en los años 90. Estos métodos se clasifican en dos categorías: la proteómica “ascendente” y la proteómica “descendente”. En la primera, se requiere la digestión previa de las proteínas para su separación y análisis por espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS). La formación de péptidos pequeños mediante la digestión tiene múltiples ventajas, siendo las principales una mayor eficiencia en la separación y un incremento de la homogeneidad de la muestra. Este método ha sido el predominante durante un largo periodo de tiempo debido a las limitaciones técnicas de la espectrometría de masas.

No obstante, posee una limitación clave, ya que al digerir las proteínas en péptidos pequeños se puede perder la proteoforma perdiendo así información sobre su actividad biológica, así como la ubicación de las modificaciones postraduccionales (Cupp-Sutton & Wu, 2020). Estos problemas no se dan en la proteómica “descendente”, ya que en este método no se requiere digestión proteica y se basa en la captura iónica de la proteína por un espectrómetro de masas para su posterior identificación.

Esto permite identificar las isoformas que se dan después de los cambios postraduccionales. Estas isoformas pueden tener diferentes efectos en importantes procesos biológicos, incluyendo la regulación génica, la señalización celular y la actividad de las proteínas. En consecuencia, la capacidad de caracterizar estas especies es esencial para comprender la respuesta biológica a la enfermedad. La identidad de una forma proteica a menudo puede inferirse a partir de una masa intacta determinada experimentalmente. Asimismo, se puede aumentar la sensibilidad de la identificación de isoformas basada en la masa intacta determinando la abundancia relativa de un aminoácido concreto mediante el etiquetado isotópico. Para ello, se utiliza las similitudes entre las masas para agrupar las proteoformas en familias de genes mediante bases de datos de búsqueda específicas para cada muestra (Donnelly et al., 2019).

La proteómica tiene un amplio rango de aplicación en la investigación científica que abarca desde el análisis de perfiles de expresión proteica, vías de señalización o el desarrollo de métodos para la investigación de biomarcadores de proteínas. En el ámbito de la toxicología alimentaria y concretamente en el estudio de las micotoxinas, existen diferentes aplicaciones. Por un lado, mejora la comprensión del comportamiento celular de los hongos mediante el estudio de los diferentes patrones de contenido proteico y aporta información sobre el efecto de los factores bióticos y cómo inducen variaciones en el perfil proteico durante el desarrollo del cultivo. Por otro lado, el perfil proteico proporciona información sobre la respuesta de los animales y humanos a la exposición a micotoxinas y la aparición de posibles biomarcadores asociados a su toxicidad (Eshelli et al., 2018). En la tabla 2, se incluye una relación de los estudios proteómicos sobre la toxicidad de micotoxinas.

El análisis proteómico de espermatozoides de toro tratados con AFB1 reveló una expresión diferencial de proteínas asociadas a procesos biológicos y vías celulares que intervienen en la función del espermatozoide, la competencia de la fecundación y el desarrollo embrionario. Las proteínas expresadas de forma diferencial estaban implicadas en cuatro procesos biológicos y



siete vías celulares y en nueve procesos y 16 vías, en el grupo de control en comparación con los espermatozoides tratados con AFB1, respectivamente. Algunas de estas proteínas estaban implicadas en importantes vías celulares, como las vías de señalización del receptor EGF y PI3K y la vía de señalización Wnt. En definitiva, el análisis proteómico de los espermatozoides tratados con AFB1 reveló las proteínas expresadas diferencialmente (DEPs) implicadas en la función del espermatozoide y su capacidad de fertilización (Tabla 2) (Komsky-Elbaz et al., 2020).

Estudios realizados sobre la exposición de AFM1 y OTA a la barrera intestinal usando el modelo celular humano Caco-2, mostraron alteraciones transcriptómicas y proteómicas. Las DEPs fueron 69 y 134 para los tratamientos con AFM1 y OTA, respectivamente. Además, se encontraron 69 DEPs únicas con el tratamiento combinado a AFM1 y OTA. El análisis evidenció que la OTA indujo una respuesta inflamatoria, mientras que la AFM1 no lo hizo y su combinación mostró un patrón parecido al tratamiento con OTA, si bien la expresión de las citoquinas se vio aumentada con respecto a la dosis individual (Tabla 2) (Gao et al., 2020).

Para aportar información sobre la citotoxicidad inducida por OTA, se estudió la función de la Proteasa mitocondrial Lon 1 (Lonp1). Lonp1 es una proteasa multifuncional dependiente de ATP que participa principalmente en la proteólisis mitocondrial y en el control de calidad de las proteínas. Mediante ARN de interferencia, se reguló a la baja la expresión de Lonp1 en células HEK293. Los resultados de viabilidad celular revelaron que las células con deficiencia de Lonp1 eran más vulnerables a la OTA. Se identificaron 34 DEPs como resultado de la deficiencia de Lonp1, mientras que cuarenta y cuatro proteínas se expresaron diferencialmente en respuesta tanto a la deficiencia de Lonp1 como al tratamiento con OTA. El análisis de vías identificó que Lonp1 realizó su función protectora en la resistencia a la citotoxicidad renal inducida por la OTA a través de la defensa contra el estrés oxidativo inducido por la OTA en las mitocondrias, la regulación de la síntesis, modificación y reparación de proteínas, el mantenimiento del equilibrio del metabolismo de los carbohidratos y la ayuda al mantenimiento del ADNmt (Tabla 2) (Zhang et al., 2014).

Mediante el análisis proteómico de la exposición de células epiteliales del timo de ratón a ZEA, se identificaron 596 proteínas expresadas diferencialmente, encontrándose 245 sobreexpresadas y 351 reprimidas. El análisis GO sugirió que las proteínas expresadas diferencialmente participaban en la síntesis de proteínas, la fosforilación oxidativa y la unión de ATP. Además, el análisis KEGG mostró que las proteínas expresadas diferencialmente estaban relacionadas principalmente con el metabolismo mitocondrial, como el ciclo del citrato (ciclo TCA) y la fosforilación oxidativa. La combinación con otros análisis determinó que la toxicidad de ZEA en este modelo

celular vendría inducida principalmente por la disfunción mitocondrial y la inhibición de la proliferación celular (Tabla 2) (Geng et al., 2022).

Soler et al. (2020) (Tabla 2) exploraron los cambios en el proteoma inducidos por una exposición corta y no citotóxica a la ZEA en el intestino de cerdo. Los resultados mostraron que la ya conocida actividad disruptora de estrógenos provocada por ZEA podría estar relacionada con su efecto tóxico intestinal, asociando la exposición a ZEA con trastornos de la señalización celular similares a los implicados en la aparición y progresión de enfermedades como el cáncer y los trastornos inflamatorios crónicos.

Para aportar luz sobre los mecanismos de acción de la toxicidad de ZEA, la cual se ha demostrado incrementa la liberación de ROS y afecta al aparato reproductor masculino, se realizó un análisis del proteoma mitocondrial *in vitro* extraído de células de ratón de tumor de Leydig. Se identificaron un total de 52 DEPs en respuesta a la ZEA implicadas principalmente en el metabolismo energético, el transporte molecular y las funciones relacionadas con el sistema endocrino. En consonancia con el análisis proteómico mitocondrial, los niveles de ATP y Ca<sup>2+</sup> intracelular aumentaron tras el tratamiento con ZEA. Los resultados sugieren que el metabolismo de los lípidos cambió significativamente después de la exposición a dosis bajas de ZEA, dando lugar a dos alteraciones. Una es el aumento de la producción de energía a través de la promoción de la captación de ácidos grasos y la beta-oxidación, junto con un estrés oxidativo excesivo; la otra es una inhibición de la esteroidogénesis y la esterificación, lo que posiblemente resulte en la reducción de la secreción hormonal (Tabla 2) (Li et al., 2014).

En relación con la toxicidad reproductiva inducida por ZEA, se realizó un análisis del proteoma para comparar la abundancia de proteínas en los ovarios de ratones expuestos a ZEA, incluyendo como factor la obesidad para comprobar si ésta alteraba la respuesta proteómica ovárica a la exposición a esta micotoxina. En los ratones delgados, la exposición a la ZEA alteró 177 proteínas, 72 disminuyeron y 105 aumentaron su expresión. Un total de 58 proteínas fueron alteradas en los ratones obesos expuestos a la ZEA, 27 proteínas disminuyeron y 31 aumentaron. La obesidad por sí sola alteró 406 proteínas ováricas, 233 aumentaron y 173 disminuyeron. El análisis proteómico reveló cambios en la abundancia de proteínas ováricas relacionadas con la reparación de daños en el ADN, el metabolismo químico y la reproducción. En conjunto, los datos identifican alteraciones ováricas inducidas por la ZEA y apoyan que la respuesta ovárica a la exposición a la ZEA es diferente en los ratones obesos en relación a los delgados (Tabla 2) (González-Alvarez et al., 2021).

Profundizando en el análisis molecular de la exposición a ENs (EN A, EN A1, ENB, ENB1), se llevó a cabo un estudio proteómico sobre su toxicidad aguda en hígado de ratas Wistar. Los péptidos se analizaron mediante una cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas cuadrupolar de tiempo de vuelo (LC-ESI-qTOF-MS). Las proteínas se filtraron por abundancia utilizando el software Mass Professional Profiler (Agilent Technologies) y 57 se expresaron de forma diferencial en comparación con el control. El biomarcador de daño hepático Carboamoil-fosfato sintasa mostró los niveles más altos de expresión para todas las condiciones empleadas, mientras que la actina-1 tuvo los más bajos. El análisis bioinformático mediante la plataforma DAVID informó de que la acetilación, la región de unión a fosfato de nucleótidos:NAD y la actividad catalítica eran las rutas más afectadas. Por tanto, la exposición aguda a las ENs causó cambios en la expresión de proteínas relacionadas con los procesos celulares más importantes en las ratas estudiadas lo que induciría alteraciones hepáticas (Tabla 2) (Cimbalo et al., 2021b).

**Tabla 2.** Relación de estudios proteómicos realizados sobre micotoxinas.

MICOTOXINAS	MÉTODO DE ESTUDIO	MATRIZ BIOLÓGICA	DOSIS	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	TÉCNICA	PRINCIPALES EFECTOS	REFERENCIA
AFs	Ex vivo	Espermatozoides de toro	AFB1 10 $\mu$ M	4 h	LC-MS/MS / western blot	Toxicidad en el sistema reproductor masculino	Komsky-Elbaz et al. 2020
OTA	Ex vivo	Ovarios de ratón	40 mg/kg	15 días	LC-MS/MS / western blot	Toxicidad reproductiva	Gonzalez-Alvarez et al. 2021
	In vitro	Línea celular humana HEK293	1 $\mu$ M	5 h	nLC-MS/MS / western blot	Nefrotoxicidad y toxicidad mitocondrial	Zhang et al. 2014
	In vitro	Líneas celulares humanas HT22 y SH-SY5Y	100 $\mu$ M	24 h	MALDI-TOF / western blot	Neurotoxicidad	Yoon et al. 2009
ZEA	Ex vivo	Explantos de yeyuno de intestino de cerdo	100 $\mu$ M	4 h	nLC-MS/MS / western blot	Inmunotoxicidad intestinal	Soler et al. 2020

	In vitro	Línea celular de ratón MLTC-1	5 $\mu$ M	24 h	nHPLC-MS/MS / western blot	Toxicidad reproductiva y mitocondrial	Li et al. 2014
AFM1, OTA	In vitro	Línea celular humana Caco-2	AFM1+OTA (10 $\mu$ M)	48 h	LC-MS-MS / western blot	Inmunotoxicidad intestinal	Gao et al. 2020
ENs	In vivo	Hígado de ratas Wistar	Medium (EN A 256, ENA1 353, ENB 540, ENB1 296 mg/mL) / High (ENA 513, ENA1 706, ENB 1021, ENB1 593 mg/mL)	8 h	LC-ESI-qTOF-MS	Hepatotoxicidad	Cimbalo et al. 2021b
	In vitro	Línea celular de ratón MTEC1	25 $\mu$ g/ml	24 h	LC-MS/MS / western blot	Inhibición de la proliferación celular y disfunción de la función mitocondrial	Geng et al. 2021

### 1.4.3. Estudios metabolómicos de exposición a micotoxinas.

La metabolómica tiene como propósito revelar los metabolitos primarios o secundarios que están presentes en el metaboloma de una muestra biológica bajo un conjunto determinado de condiciones que se conoce como fenotipo. El metaboloma es la colección de todos los metabolitos de bajo peso molecular ( $\leq 1000$  Da), que son producidos por una célula viva durante su metabolismo, y proporciona la visión más cercana al comportamiento fisiológico de la célula. El perfil metabólico de una muestra biológica pone de manifiesto los metabolitos que se agotan o se generan en mayor o menor cantidad en respuesta a diferentes condiciones ambientales, genéticas, patológicas y de desarrollo. Aunque la tecnología analítica está avanzando rápidamente, todavía existen importantes lagunas en nuestro conocimiento de la interrelación bioquímica entre las micotoxinas y los organismos a los que afectan. La metabolómica nos permite profundizar en las alteraciones provocadas por las micotoxinas, ya que mediante análisis informáticos podemos identificar los metabolitos que provocan estas intoxicaciones y si estas están relacionadas con la aparición de patologías.

Los estudios metabolómicos pueden clasificarse en enfoques dirigidos o no dirigidos. El enfoque de la metabolómica dirigida suele utilizarse cuando el científico tiene un conjunto de metabolitos que medir o una pregunta específica que responder. Sin embargo, el enfoque no dirigido se utiliza para identificar tantos metabolitos como sea posible sin prestar atención a metabolitos específicos. Por tanto, en condiciones experimentales, es posible identificar un perfil metabolómico concreto determinado por la exposición a una o varias micotoxinas respecto a un organismo control (Eshell et al., 2018). En la tabla 3, se incluye una relación de los estudios metabolómicos realizados sobre micotoxinas.

Utilizando el análisis de microarrays y el análisis de metabolitos, se identificaron cambios en la expresión génica y en los niveles de metabolitos asociados a los procesos fisiológicos afectados de las ratas tratadas con AFB1. El análisis integrado de los resultados de los estudios de toxicidad general, de la transcriptómica y de los perfiles metabólicos sugirió que la vía de señalización p53 inducida por el daño oxidativo era el paso crucial en la hepatotoxicidad aguda inducida por la AFB1, mientras que la gluconeogénesis y el trastorno del metabolismo de los lípidos resultaron ser los principales efectos metabólicos tras la exposición aguda a la AFB1 (Tabla 3) (Lu et al., 2013).

En la línea de los estudios in vivo, se realizaron estudios sobre el pez cebra, para caracterizar los perfiles metabólicos asociados a la exposición a la AFB1. La toxicidad de la AFB1 fue dependiente de la etapa de desarrollo. Los perfiles metabólicos de los embriones intactos de pez cebra expuestos a la AFB1 fueron ampliamente consistentes con la hepatotoxicidad previamente reportada en sistemas de mamíferos, incluyendo metabolitos asociados con la citotoxicidad, la desintoxicación basada en el glutatión, y múltiples vías asociadas con el hígado, incluyendo el metabolismo de aminoácidos, lípidos y carbohidratos. Además, los cambios encontrados en los neurotransmisores de aminoácidos, como modulador clave del desarrollo neuronal, apoyan un efecto neurotóxico de la AFB1, tanto a nivel de desarrollo como en el comportamiento del embrión de pez cebra (Tabla 3) (Zuberi et al., 2019).

Para entender las respuestas de los sistemas biológicos a diferentes niveles de exposición a la AFB1 en los biomarcadores de los fluidos biológicos (líquido ruminal, leche y sangre) mediante pruebas metabolómicas y bioquímicas, se realizó un estudio sobre vacas lecheras. Los resultados mostraron que la concentración de aflatoxina M1 (AFM1) en la leche cambió con la adición o la eliminación de AFB1. La AFB1 afectó significativamente a las concentraciones séricas de superóxido dismutasa (SOD) y malon-dialdehído (MDA), SOD/MDA, y a la capacidad antioxidante total.

Se detectaron diferencias significativas de ácidos grasos volátiles y NH3-N en el líquido ruminal. Dieciocho metabolitos del líquido ruminal, 11 metabolitos del plasma y 9 metabolitos de la leche se vieron significativamente afectados por la AFB1. Estos metabolitos están principalmente implicados en la vía del metabolismo de los aminoácidos (Tabla 3) (Wang et al., 2019).

Por otro lado, se llevó a cabo un amplio estudio metabolómico no dirigido tras la exposición de AFB1 a células Hep3B. Se identificaron un total de 2679 metabolitos y se cuantificaron 392 metabolitos diferenciales entre los tres grupos. El análisis de indicó que varias vías se vieron alteradas significativamente, incluyendo el metabolismo de la purina y la pirimidina, la vía de la hexosamina y la sialilación, la síntesis y oxidación de ácidos grasos, el metabolismo de los glicerofosfolípidos, el TCA, la glucólisis y el metabolismo de los aminoácidos (Tabla 3) (Wang et al., 2021).

Después de la administración de ZEA intragástrica a ratas, se analizaron sus muestras de orina y plasma. El análisis metabolómico, sugiere que la exposición puede causar estrés oxidativo y cambiar los procesos metabólicos sistémicos comunes, incluyendo el metabolismo de la membrana celular, la biosíntesis de proteínas, la glucólisis y el metabolismo de la microbiota intestinal (Tabla 3) (Liu et al., 2013).

Se conoce que la exposición a la ZEA afecta significativamente al desarrollo folicular y a la formación del antro, pero no así sus mecanismos subyacentes. Por lo tanto, en este estudio, se exploraron los cambios metabolómicos tras la exposición a ZEA en ovocitos de rata. Los resultados mostraron que la ZEA aumentó significativamente los aductos de fosfatidilcolina o fosfatidil etanolamina en el medio de cultivo. Profundizando en el análisis se evidenció que la lisofosfatidilcolina se acumulaba durante el crecimiento del folículo, pero se agotaba con la exposición a la ZEA. Esto sugiere que un suplemento exógeno de lisofosfatidilcolina en el medio de crecimiento del folículo o en el medio de maduración de los ovocitos puede proteger en parte el defecto de la exposición a la ZEA en la formación del antro folicular y la maduración de los ovocitos (Tabla 3) (Lai et al., 2018).

Estudios de nefrotoxicidad en ratones CD-1 tratados con AFM1 y OTA, individualmente y en combinación, mostraron que en comparación con el grupo control, los tres tratamientos con redujeron significativamente el peso corporal final, elevaron notablemente la concentración de creatinina sérica y causaron fenotipos histológicos anormales (mostrados por cortes histopatológicos). OTA, AFM1+OTA pero no AFM1 redujeron el índice de peso relativo del riñón. Estos resultados fenotípicos indicaron que tanto AFM1 como OTA eran tóxicos para el organismo, y parecía que OTA

mostraba un notable deterioro del riñón mientras que AFM1 tenía un efecto similar pero limitado en comparación con OTA. Hubo pocas diferencias en el número de metabolitos modificados entre el grupo de OTA y el de AFM1+OTA. Entre los metabolitos expresados diferencialmente y afectados por la OTA y la AFM1+OTA, se identificaron las lisofosfatidilcolinas como el tipo principal (Tabla 3) (Wang et al., 2021).

Para evaluar los efectos combinados de DON y ZEA *in vitro*, se realizó un análisis completo del metaboloma de las células ANA-1 de macrófagos murinos. Las vías metabólicas alteradas principalmente fueron el metabolismo de los aminoácidos y el metabolismo de los glúcidos (Tabla 3) (Ji et al., 2016).

Complementando el trabajo descrito anteriormente, Ji et al., (2018) usaron ratones para analizar el perfil metabólico de su orina tras la exposición combinada a las micotoxinas DON y ZEA. Los resultados mostraron que la administración combinada de DON+ZEA dio lugar a cambios menos significativos, en comparación con los grupos tratados individualmente con micotoxinas. El análisis de las rutas metabólicas indicó que los grupos tratados con las micotoxinas combinadas mostraron un ligero efecto sobre los metabolitos en la mayoría de las vías, especialmente en el metabolismo de la glucosa y el metabolismo de aminoácidos. Además, los ácidos orgánicos, el piruvato y el metabolismo de los aminoácidos mostraron el mismo fenómeno. La administración combinada de DON+ZEA podría conducir a un “efecto antagónico” en el metabolismo de los ratones. Por otro lado, se estudió el perfil metabólico en el hígado y el suero de ratones para determinar los efectos tóxicos combinados de DON y ZEA. El análisis de la vía metabólica demostró que el tratamiento combinado de DON+ZEA podría regular a la baja la biosíntesis de valina, leucina e isoleucina, el metabolismo de la glicina, serina y treonina, y el metabolismo de la glucosa relacionado con los compuestos O-glicosil en el tejido hepático (Tabla 3).

En la línea de los estudios realizados por el mismo grupo, se realizó el análisis metabólico en células Caco-2 de los efectos tóxicos combinados de DON, ZEA y AFB1 para evaluar su toxicidad a nivel intestinal. Los resultados muestran que el tratamiento combinado de DON+AFB1 y DON+ZEA+AFB1 tiene un “efecto sinérgico”. Los grupos combinados de micotoxinas, DON+ZEA+AFB1 afectaron seriamente al metabolismo de la glicina, serina y treonina y al metabolismo del piruvato, mientras que no se presentaron trastornos metabólicos en las exposiciones individuales a estas micotoxinas (Tabla 3) (Ji et al., 2019).

En definitiva, los estudios metabólicos sobre el efecto de las micotoxinas a nivel toxicológico son una herramienta que aporta información relevante, ayudando a dilucidar los mecanismos de acción de esta y contribuyendo a la búsqueda de biomarcadores para su identificación. En este trabajo, se expone el primer estudio metabólico no dirigido sobre la exposición de la OTA, la ENB y la BEA a células de barrera hematoencefálica (BHE) *in vitro* (ECV304 diferenciadas) y el posible efecto protector del extracto de calabaza, rico en carotenoides y flavonoides.

**Tabla 3.** Relación de estudios metabólicos realizados sobre micotoxinas.

MICOTOXINAS	MÉTODO DE ESTUDIO	MATRIZ BIOLÓGICA	DOSIS	TIEMPO DE EXPOSICIÓN	TÉCNICA	PRINCIPALES EFECTOS	REFERENCIA
AFB1	In vivo	Ratas Fischer 344	1 mg/kg/día	7 días	GC-MS	Hepatotoxicidad	Lu et al. 2013
	In vivo	Pez zebra	1 µM	24h	NMR	Hepatotoxicidad y neurotoxicidad	Zubiri et al. 2019
	In vivo	Líquido ruminal, leche y sangre de vacas lecheras	20 and 40 µg/kg tres veces al día	7 días	NMR	Alteración de los procesos de oxidación reducción y del metabolismo de los aminoácidos	Wang et al. 2019
	<i>In vitro</i>	Línea celular humana Hep3B	16 µM and 32 µM	6 días	UPLC-MS	Hepatotoxicidad	Wang et al. 2021
ZEA	In vivo	Orina de rata Sprague Dawley	3 mg/kg 2 veces a la semana (intragástrica)	14 días	NMR	Alteración de metabolismo de la membrana celular, la biosíntesis de proteínas, la glucólisis y el metabolismo de la microbiota intestinal	Liu et al. 2013

	Ex vivo	Células de la granulosa	10 µM	24h	UPLC-QTOF / UPLC MS/MS	Alteración de la lisofosfatidilcolina	Lai et al. 2018
<b>AFM1, OTA</b>	In vivo	Ratones	20 - 40 µM	24 h	RNA-seq	Apoptosis e inhibición del crecimiento celular	Zhang et al., 2019
<b>CD-1</b>	AFM1 3,5; OTA 3,5; AFM1+OTA (3,5+3,5)	35 días	UPLC-MS	Nefrotoxicidad	Wang et al. 2021	Wang et al. 2021	Pyo et al., 2021
<b>DON, ZEA</b>	In vivo	Orina de ratones kunming	DON 2; ZEA 20; DON +ZEA (2+20) mg/kg	21 días	GC-MS	Alteración del metabolismo de la glucosa y de los aminoácidos	Ji et al. 2018
	In vivo	Suero e hígado de ratones kunming	DON 2; ZEA 20; DON+ZEA (2+20) mg/kg	21 días	GC-MS	Alteración del metabolismo glucídico y de los aminoácidos	Ji et al. 2018
	In vitro	Línea celular de ratón ANA-1	DON 1; ZEA 8; DON + ZEA (1+8) ppm	24 h	GC-TOF/MS	Alteración del metabolismo del ácido palmítico y de la ruta de las pentosas fosfato	Ji et al. 2016
<b>AFB1, DON, ZEA</b>	In vitro	Línea celular humana Caco-2	DON 6,7; ZEA 20; AFB1 20; DON + AFB1 (6,7+20); DON + ZEN + AFB1 (6.7 + 20 + 20) µM	24h	GC-MS	Alteración del metabolismo de la glicina, serina y treonina y el metabolismo del piruvato	Ji et al. 2019

## 1.5. Efectos neurotóxicos por exposición a micotoxinas y mitigación mediante el uso de carotenoides.

Los mecanismos moleculares detrás de los efectos tóxicos de las principales micotoxinas están establecidos y se ha demostrado que el estrés oxidativo y la generación de radicales libres están implicados en gran medida. De hecho, el desequilibrio entre la generación de ROS y los sistemas de defensa antioxidantes puede causar daños químicos en el ADN, las proteínas y los lípidos (Cimbalo et al., 2020).

Las micotoxinas, una vez absorbidas por el tracto digestivo, pasan a la circulación alcanzando diferentes órganos periféricos como el cerebro. Aunque el mecanismo de acción de estas toxinas no se conoce del todo, pueden atravesar la BHE y causar efectos neurotóxicos (Nguyen et al., 2022; Pei et al., 2021; Doi et al., 2011). La neurotoxicidad podría estar relacionada con efectos sobre las mitocondrias, ya que se sabe que muchos de ellos causan disfunción mitocondrial al producir estrés oxidativo e inducir la formación de ROS (Nourbakhsh et al., 2021). Las neuronas son muy susceptibles al estrés oxidativo, ya que consumen grandes cantidades de oxígeno a través de la fosforilación oxidativa (Karbowski & Neutzner, 2012). Por otro lado, hay estudios previos que concluyen que tanto las micotoxinas reguladas como las emergentes inducen la muerte celular apoptótica (Bensassi et al., 2012; Prosperini et al., 2013). Las ROS pueden activar la muerte celular apoptótica a través de la vía intrínseca también llamada vía mitocondrial, ya que las señales de inicio de este mecanismo desencadenan las mitocondrias (Moll & Zaika, 2001).

La disfunción mitocondrial se caracteriza por la pérdida de eficiencia en la CTE y la reducción de la síntesis de moléculas de alta energía, principalmente adenosina-5'-trifosfato (ATP). Este es un rasgo característico del envejecimiento y esencial para todas las enfermedades crónicas. Las enfermedades relacionadas con la disfunción mitocondrial incluyen el cáncer, las infecciones crónicas, enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis y otras afecciones cardíacas y vasculares, la diabetes y el síndrome metabólico, enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico y la diabetes de tipo I. Otras enfermedades dependientes de la disfunción mitocondrial son las enfermedades neuroconductuales y psiquiátricas, como los trastornos del espectro autista, la esquizofrenia y los trastornos bipolares y del estado de ánimo, los trastornos gastrointestinales y las enfermedades musculoesqueléticas, como la fibromialgia y la hipertrofia/atrofia muscular esquelética. Las enfermedades neurodegenerativas como la EA, el Parkinson, el Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la ataxia de Friedreich también están relacionadas con la disfunción mitocondrial (Islam et al., 2018).

La deficiencia del Complejo I (CI) es la anomalía genética más común de la CTE, siendo responsable de aproximadamente un tercio de los trastornos relacionados con la fosforilación oxidativa. La oxidación de la cisteína también está mediada por señales redox, que a su vez regulan la actividad de la CI. Por lo tanto, incluso defectos mínimos en las señales redox de la CI pueden generar una alteración de la fosforilación oxidativa que conduzca al estrés oxidativo provocando la enfermedad. La reducción de la actividad del CI en el Sistema Nervioso Central (SNC) de pacientes con la enfermedad de Parkinson (EP), podría llevar a un desequilibrio de ROS que provocaría daños en el ADN mitocondrial (ADNmt). Las mutaciones y polimorfismos en el ADNmt también se han asociado al desarrollo de la EP o al aumento del riesgo de EP (Lin y Beal, 2006). Asimismo, el centro binuclear del Complejo IV (CIV) se ha asociado con diversas patologías, incluida la enfermedad de Alzheimer (EA) (Hu et al., 2017). La actividad del complejo V (CV) disminuye con el envejecimiento, y la supresión de la actividad del CV provoca daños oxidativos en el ADN nuclear, lo que podría dar lugar a una menor expresión génica con el envejecimiento. Por otro lado, existen evidencias de que las enfermedades neurodegenerativas están relacionadas con la disminución de la síntesis de ATP (Van Bulck et al., 2019).

Dado que la exposición de los seres humanos y los animales a las micotoxinas es inevitable, se requieren formas eficaces de mitigar sus impactos nocivos. Varios estudios han demostrado los efectos beneficiosos de las sustancias antioxidantes en la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, se ha demostrado que el uso de antioxidantes naturales mitiga y/o previene los efectos tóxicos de las micotoxinas (Da Silva et al., 2018).

Los carotenoides son una de las familias de antioxidantes que más se ha investigado como posible protector contra el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Son una familia de pigmentos amarillos, anaranjados y rojos que se encuentran en plantas, hongos, bacterias y algas. Desempeñan un papel importante en la fotosíntesis al ampliar la gama de longitudes de onda de la luz que impulsa la reacción. Hay más de 600 tipos de carotenoides en la naturaleza que proporcionan una gran variedad de beneficios para la salud. Los numerosos tipos de carotenoides se clasifican en dos grandes grupos: los carotenos y las xantofilas. Los carotenos se basan en la estructura de del licopeno, el  $\beta$ -caroteno y el  $\alpha$ -caroteno, basándose en que contiene sólo una cadena de hidrocarburos. Por el contrario, las xantofilas consisten en estructuras que contienen oxígeno como grupo funcional, como la beta-criptoxantina, la neoxantina, la astaxantina, la cantaxantina, la zeaxantina, la fucoxantina y la luteína (Yabuzaki, 2017). Los carotenoides están muy presentes en la dieta humana, siendo componentes principales de algunas frutas como la calabaza o las fresas y de verduras las zanahorias o espinacas. También se ha observado que casi 20 tipos de carotenoides están presentes en la sangre y los tejidos del cuerpo humano. La expe-

rimentación con suplementos de carotenoides puede afectar al estado redox celular, la expresión génica, las respuestas inmunitarias, el crecimiento celular y el desarrollo. Los carotenoides actúan como antioxidantes para bloquear los desencadenantes de la apoptosis y la disfunción mitocondrial asociada a los ROS. Así, los carotenoides evitan el déficit energético y la posterior activación de las moléculas apoptóticas derivadas de las mitocondrias. Además, los carotenoides influyen en numerosos factores de transcripción, como Nrf2 y NF- $\kappa$ B, para regular los genes de la apoptosis, la defensa antioxidante y la inflamación (Park & Ellis et al., 2017).

Los experimentos *In vitro* en células humanas han demostrado los efectos protectores de los carotenoides en un amplio espectro de modelos experimentales debido a su capacidad antioxidante. Gong et al., (2017) expusieron células epiteliales humanas de la retina a diferentes concentraciones de luteína, licopeno y  $\beta$ -caroteno para comprobar el posible efecto protector de los carotenoides maculares, encontrando que la luteína y el licopeno inhibían el crecimiento de las células epiteliales pigmentarias de la retina humana y las protegían contra la muerte celular inducida por el estrés oxidativo. Nishide et al., (2015) probaron el efecto protector de las isoflavonas de soja y el  $\beta$ -caroteno (0,1-10  $\mu$ M) en la diferenciación de los osteoblastos, resultando en una diferenciación temprana inducida por el  $\beta$ -caroteno, que podría conducir a un balance positivo del recambio óseo.

La luteína y la luteína oxidada indujeron un doble efecto prometedor en las células ARPE-19 hiperglucémicas y en la retina de rata, estimulando la actividad mitocondrial mediante la regulación al alza de MT-ND4 y reduciendo el incremento de ROS asociado mediante la regulación al alza de SOD1 y SOD2 (Nanjaiah y Vallikannan, 2019). También se ha evidenciado que la astaxantina aumenta la vida útil de *C. elegans* en más de un 20 % mediante el desensamblaje del CIII y la reducción de las especies de ROS, confirmando el mismo efecto en otras especies utilizando mitocondrias de ratones, ratas, plantas y humanos (Hoffman et al., 2019).

Los estudios de neurotoxicidad de exposición a micotoxinas realizados hasta la fecha, muestran que uno de los principales mecanismos de acción es la alteración de la función mitocondrial, la disrupción de los sistemas de defensa antioxidantes, el incremento de ROS y la peroxidación lipídica. El tratamiento con bajas concentraciones de AFB1 en células primarias de la BHE reveló efectos citotóxicos que probablemente afectan a la integridad de la barrera, permitiendo la posible entrada en el cerebro (Qureshi et al., 2015). Por otro lado, se evidenció que la AFB1, además de atravesar la BHE, indujo neuroinflamación en las células microgliales con estrés oxidativo y apoptosis (Mehrzhad et al., 2018). Asimismo, la exposición a AFB1 se ha relacionado con la disrupción

de la BHE, que condujo a una descompensación en todo el cerebro con la muerte de astrocitos (Vahidi-Ferdowsi et al., 2018). Además, varios estudios en modelos animales de ratas y peces revelaron evidencias claras de los efectos tóxicos de la AFB1 en el sistema nervioso (Ikegwonu, 1983; Park et al., 2020).

La administración aguda de AFB1 a ratas jóvenes causó el agotamiento de las defensas antioxidantes no enzimáticas, como el ácido ascórbico (Souto et al., 2018). La exposición oral crónica de hasta tres meses reveló una disminución de los antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutasa y la glutasa peroxidasa (Alsayyah et al., 2019). Además, la administración de AFB1 provocó la generación de ROS, vasodilatación, necrosis de células gliales y neuronales, y gliosis (Alsayyah et al., 2019; Bahey et al., 2015). Esto se correlaciona perfectamente con estudios *in vitro* que revelan la citotoxicidad de la AFB1 en diferentes células neuronales y gliales de ratones y humanos, asociada a un aumento de los niveles de ROS, una reducción de los niveles de ATP y un aumento de la liberación de factores inflamatorios (Park et al., 2020; Souza et al., 2019; Mehrzad et al., 2018). En particular, la administración crónica de AFB1 en organismos modelo de ratas y peces causó respectivamente una disminución de la de la creatina quinasa, altamente vulnerable al estrés oxidativo, lo que resulta en una menor generación de ATP (Alsayyah et al., 2019; Souza et al., 2019). Esto indica que la AFB1 no sólo induce la inflamación, sino que también afecta al metabolismo energético, probablemente como consecuencia del estrés oxidativo.

Del mismo modo, la neurotoxicidad de la OTA está bastante bien documentada. Esta micotoxina, se encontró en el cerebro de los roedores tras su aplicación por diferentes vías, oral e intraperitoneal o intraventricular, lo que lleva a suponer que la OTA puede atravesar la BHE (Kaya et al., 2019; Sava et al., 2006a). Del mismo modo, la OTA atravesó la BHE induciendo la muerte celular en un modelo neuronal *in vitro* con células SH-SY5Y (Zhang et al., 2009).

La intoxicación con OTA provocó un agotamiento de la dopamina estriatal y una disminución de las fibras positivas a la tirosina hidroxilasa en el estriado, la sustancia negra y el locus ceruleus de ratas. Los estudios conductuales indican un fenotipo de movimiento parkinsoniano, que incluye bradicinesia e inestabilidad de la marcha. Posteriormente, se les trató con L-Dopa, un precursor de la dopamina, para explorar sus posibles efectos protectores contra la OTA. Los resultados de los estudios de comportamiento, como el análisis de la marcha, la actividad espontánea, la prueba del cilindro y la prueba de la pértiga, mostraron que la OTA induce fisonomías parkinsonianas que se estabilizaron con el tratamiento con L-Dopa. Además, la toxicidad de la OTA mostró alteraciones en los niveles de neurotransmisores y en los parámetros generales de la función cerebral que se

normalizaron con el tratamiento con L-Dopa. También funciones cognitivas se vieron afectadas por la administración subcrónica de OTA a ratas, yendo acompañadas de una disminución de los niveles de receptores de N-metil-D-aspartato en el hipocampo (Bhat et al., 2018).

Asimismo, la aplicación crónica de OTA resultó en niveles reducidos de los aminoácidos libres tirosina y fenilalanina, necesarios para la producción de monoamina y que podrían ser la causa de la disminución de los niveles de dopamina y sus metabolitos en el cerebro de los roedores (Bhat et al., 2018; Sava et al., 2006b). Además del impacto sobre las catecolaminas, la administración aguda de OTA está asociada con el estrés oxidativo, como indicado por el aumento de la peroxidación lipídica, los niveles de SOD el daño oxidativo del ADN y la inhibición de la actividad de reparación del ADN (Sava et al., 2006a).

Para identificar si la exposición a la OTA podría tener un papel en la patología de la EP, se emplearon ratones modelo pretratados con fibrillas preformadas de alfa-sinucleína. A los ratones control y pretratados se les administró oralmente OTA durante cuatro semanas y se les mantuvo seis meses más con una dieta normal. Se evaluaron los efectos de la OTA en el inicio, la progresión de la patología producida por la alfa-sinucleína y el desarrollo de déficits motores. Los análisis inmunohistoquímicos y bioquímicos mostraron que el tratamiento oral subcrónico con OTA indujo la pérdida de la inervación dopaminérgica estriatal y la disfunción de las células dopaminérgicas responsables de los déficits motores. Los niveles de  $\alpha$ -sinucleína fosforilada aumentaron en el intestino y el cerebro, mientras que la proteína LAMP-2A estaba disminuida en los tejidos que mostraban la patología de la alfa-sinucleína. Los cultivos celulares expuestos a la OTA mostraron una disminución de la proteína LAMP-2A, una alteración de la autofagia mediada por chaperonas y una disminución del recambio de alfa-sinucleína que se vinculó a la desregulación de los miRNAs. Todas ellas son alteraciones que se dan en la EP (Izco et al., 2021).

Los estudios en células neuronales revelaron un aumento de la generación de ROS tras la administración de OTA, lo que lleva a la activación de caspasas y p53 en un contexto de pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, lo que da lugar a la apoptosis (Bhat et al., 2016; Yoon et al., 2009; Zhang et al., 2009). El tratamiento con OTA también afectó a varias proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis mediada por el estrés oxidativo y que se sabe que están relacionadas con las enfermedades neurodegenerativas (Yoon et al., 2009). Sin embargo, estudios realizados sobre líneas celulares de neuroblastoma revelaron resultados contradictorios sobre la activación de caspasas inducida por la OTA (Yoon et al., 2009; Zhang et al., 2009).

La investigación en células madre neurales en cultivos celulares aislados puso de manifiesto que las células inmaduras se veían menos afectadas por OTA en términos de viabilidad que las células maduras, mientras que los resultados recogidos en cultivos cerebrales 3D de ratones mostraron efectos opuestos a dosis de OTA no citotóxicas. Por lo tanto, OTA podría afectar a la neurogénesis mediante la disminución de la proliferación de células no diferenciadas (Zurich & Honegger, 2011). La viabilidad de los astrocitos también se ha visto afectada por la administración de OTA (Paradells et al., 2015; Sava et al., 2007). Por último, otros estudios realizados en cultivos de cerebro de ratón en 3D mostraron que los niveles no citotóxicos así como niveles más altos de OTA, alteran las estructuras citoesqueléticas de las neuronas y los astrocitos, lo que provoca neuroinflamación (von Tobel et al., 2014).

La citotoxicidad inducida por OTA se asoció a un aumento de los niveles de calcio intracelular, una proliferación inhibida y una pérdida del potencial de la membrana mitocondrial provocando apoptosis. Estos estudios muestran pruebas convincentes de que la OTA puede inducir la neurodegeneración a través de diferentes vías incluyendo la síntesis de neurotransmisores, el estrés oxidativo y la activación de quinasas de estrés (vías AKT y MAPK), lo que resulta en un deterioro de la neurotransmisión, la reducción de la proliferación y el aumento de la apoptosis (Park et al., 2019).

En relación a la ZEA, se llevó a cabo la evaluación de su neurotoxicidad *in vivo* utilizando como modelo *C. elegans*. Los resultados demostraron que el daño a las neuronas dopaminérgicas fue inducido por la exposición a ZEA induciendo la fragmentación mitocondrial significativamente. Estas características están relacionadas con la EP (Wei et al., 2021). Usando un modelo experimental diferente, Muthulakshmi et al., (2018) demostraron que la alteración del balance oxidativo era la principal vía de inducción de genotoxicidad y neurotoxicidad en embriones de pez cebra.

Este aspecto también se corrobora en un estudio *in vitro* realizado sobre el modelo de células neuronales SH-SY5Y no diferenciado. En este caso, se evaluó el papel del estrés oxidativo en la neurotoxicidad mediada por ZEA y se investigó su mecanismo de acción. ZEA indujo la formación de ROS, niveles elevados de malondialdehído, la pérdida de potencial de membrana mitocondrial y el aumento del daño en el ADN. Además, las células SH-SY5Y tratadas con ZEA mostraron un marcado efecto supresor sobre la expresión génica. Por otro lado, el uso del antioxidante N-acetilcisteína revirtió la generación de ROS inducida por la toxina y también atenuó la pérdida de potencial de membrana mitocondrial. Estos resultados sugieren que las ROS son la principal señal ascendente que conduce al aumento de la neurotoxicidad mediada por ZEA en las células SH-SY5Y no diferenciadas (Pérez-Fuentes et al., 2021; Venkataramana et al., 2014). Usando el mismo

modelo, se demostró que los derivados alfa-zearalenona y beta-zearalenona, individualmente y en combinación, produjeron alteraciones del ciclo celular y en el sistema antioxidante Glutación Peroxidasa (Agahi et al., 2021a; Agahi et al., 2021b).

Respecto a las micotoxinas emergentes BEA y ENs, la información sobre su neurotoxicidad es escasa. Se ha demostrado que tanto la BEA como las ENs pueden penetrar la BHE, produciendo alteraciones en la misma, y alcanzar el cerebro (Krug et al., 2018; Taevernier et al., 2016). Agahi et al., (2021a, b) usando el modelo *in vitro* SH-SY5Y, puso en evidencia que la BEA era capaz de alterar el ciclo celular y la Glutación peroxidasa. Asimismo, tanto BEA como la ENA y la ENB, individualmente y en combinación, fueron capaces de alterar el potencial de membrana mitocondrial provocando apoptosis. Hay que tener en cuenta que estos estudios *in vitro* se han efectuado sobre células no diferenciadas que expresan ciertos marcadores neuronales, pero no el fenotipo completo (Kovalevich et al., 2021).

A continuación, se expone en la tabla 4 una relación de los estudios de neurotoxicidad sobre micotoxinas explicados anteriormente.

**Tabla 4.** Estudios de neurotoxicidad de exposición a micotoxinas.

MICO-TOXI-NAS	MÉTODO DE ESTUDIO	MATRIZ BIOLÓGICA	DOSIS	TIEMPO DE EXPO-SICIÓN	TÉCNICA	PRINCI-PALES EFEC-TOS	REFEREN-CIA
AFB1	In vivo	16 µg/kg/día	6 se-manas	cerebro de ratas Wistar	determinación de β-glucuronidasa, βgalactosidasa, actividad ATPasa y contenidos de ARN, ADN, proteínas totales y fosfolípidos.	dege-neración del sistema ner-vioso central y peri-férico	Ike-gwuonu, 1983
	In vivo	250 µg/kg/p.c.	48 h	ratas Wistar	Pruebas de comporta-miento / ensayos de neurotoxicidad	deuro-toxicidad	Souto et. al., 2018
	In vivo	0,025 mg/10 mL aceite de oliva/kg p.c./día)	30 - 60 - 90 días	cerebro de ratas Wistar	ensayos de oxidación / ensayos enzimáticos / inmunoquímica	neu-rode-gene-ración relacio-nada con AD	Alsayyah et. al., 2019



	In vivo	1177 µg/kg de pienso	7 - 14 - 21 días	siluro de plata	ensayos de estrés oxidativo / actividad de la creatinina quinasa / actividad de la ATPasa	inhibición de la vía de la creatinina quinasa vía estrés oxidativo	Souza et al., 2019
	In vivo / In vitro	1 - 50 µM	2 - 48 h	pez cebra / línea celular de astrocitos humanos NHA-SV40LT	células NHA-SV40LT: ensayo de proliferación / inmunofluorescencia / análisis celular / ensayo de la anexina V / determinación de ROS / determinación del potencial de membrana mitocondrial / western blot / determinación de calcio / pez cebra: RT-qPCR	apoptosis / parada del ciclo celular	Park et al., 2020
	In vitro	3 - 32 nM	24 h	cultivo primario: células endoteliales microvasculares del cerebro humano y células endoteliales de la vena umbilical humana/ línea celular humana hepato carcinoma Huh7	detección lactato deshidrogenasa / inmunofluorescencia	citotoxicidad en células primarias / formación de aductos de ADN en todos los tipos celulares	Qureshi et al., 2015
	In vitro	5 - 100 ng/µL	1 - 48 h	línea celular humana de la microglia CHME5	detección lactato deshidrogenasa / inmunofluorescencia	inmunotoxicidad	Mehrzhad et al., 2018
	In vitro	8 - 32 nM	6 - 72 h	cultivo primario de astrocitos de ratón	multiplex qPCR / quimioluminiscencia / MTT/ ELISA / citometría de flujo	apoptosis	Vahidi-Ferdowsi et al., 2018

	In vitro	5 - 100 ng/µL	1 - 48 h	línea celular humana de la microglia CHME5	multiplex qPCR / quimioluminiscencia / MTT/ ELISA / citometría de flujo	inmunotoxicidad	Mehrzhad et al., 2018
	In vitro	8 - 32 nM	6 - 72 h	cultivo primario de astrocitos de ratón	ensayo MTT / expresión de la luciferasa / western blot / Tinción Anexina V / cuantificación ATP / actividad caspasa	apoptosis	Vahidi-Ferdowsi et al., 2018
OTA	In vivo	4 - 8 - 16 mg/kg /p.c.	2 semanas	cerebro de ratones suizos ICR	determinación de dopamina / ensayo mutagénico 8-oxo guanina	inducción de EP	Sava et al., 2006a
	In vivo	3,5 mg/kg/p.c.	3 - 72 h	cerebro de ratones suizos ICR	ensayo comet / ensayos enzimáticos / ensayos de peroxidación lipídica / determinación de metabolitos de la dopamina	inducción de EP	Sava et al., 2006b
	In vivo	0,01-100 µg/ml	6 - 72 h	cultivo primario de células neuronales de ratón	ensayos de citotoxicidad y proliferación celular / ensayo SOD / análisis de la reparación de ADN	alteración de la neurogénesis	Sava et al., 2007
	In vivo	30 mg/kg/p.c./ día	3 días	cerebro de ratones	ensayos de comportamiento / ensayos de funcionalidad cerebral / ensayos de parámetros bioquímicos	inducción de EP	Bhat et al., 2018
	In vivo	0.21, 0.5 mg/kg/p.c./ día	4 semanas	cerebro de ratones Balb/c / cerebro de ratones C57BL6/ C3H F1 / línea celular humana SH-SY5Y	ensayos de comportamiento / determinación de OTA / inmunohistoquímica / western blot / ensayo de la alfa-sinucleína / RT-qPCR	inducción de EP	Izco et al., 2021
	In vitro	10 nM	4 h	cultivo 3D de cerebro de embriones de rata	RT-qPCR	perturbación de la proliferación de células primarias / alteración de la neurogénesis	Zurich & Honegger, 2011

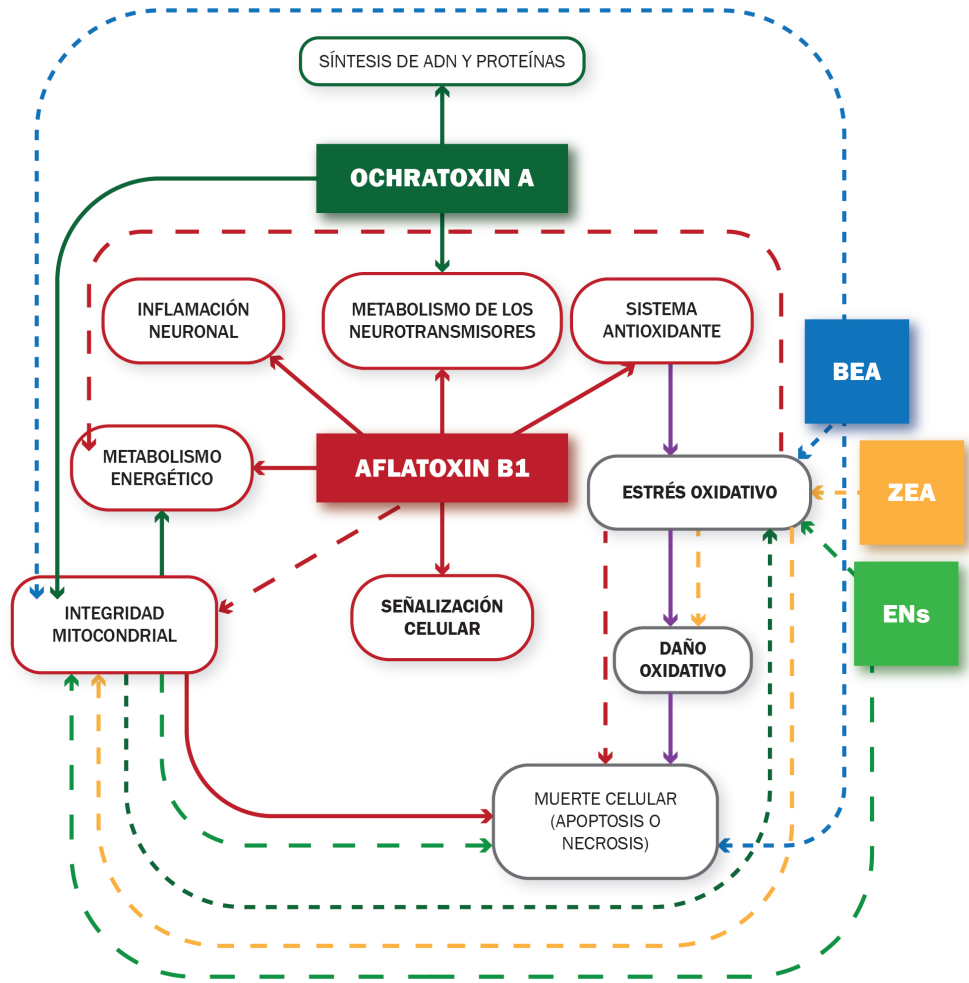
<b>BEA, ENs</b>	In vivo	0,2 mg/kg	1 - 3 - 5 - 10 - 12,5 - 15 min	ratones ICR-CD-1	ensayos permeabilidad de la BHE / determinación por UHPLC-MS	pene-tración de la BHE	Tae-ver-nier et al., 2016
<b>ENB, ENB1</b>	In vitro	0,1 - 10 µM	48 h	células endote-liales micro-vascu-lares del cerebro humano / línea celular de astrocitos CCF-STTG1	ensayo de viabilidad celular / ensayo de la caspasa 3 / ensayo de la lactato- deshidroge-nasa / determinación de ENB y ENB1 / ensayo permeabilidad de la BHE	neuro-toxici-dad	Krug et al., 2018
<b>α-ZEA, β-ZEA y BEA</b>	In vitro	0,39 - 100 µM	24 - 48 - 72 h	línea celular neuroblasto-ma SH-SY5Y	MTT / LC-ESI-qTOF-MS /	cito-toxici-dad	Agahi et al., 2020
	In vitro	1,56 - 27,5 µM	24 - 48 h	línea celular neuroblasto-ma SH-SY5Y	ensayos de actividad enzimática de estrés de oxidativo	alte-ración de la activi-dad de las en-zimas del sis-tema redox	Agahi et al. 2021
	In vitro	1,56 - 27,5 µM	24 - 48 h	línea celular neuroblasto-ma SH-SY5Y	ciclo celular por citometría de flujo / ensayo de la anexina V	neu-rotoxi-cidad induci-da por apo-ptosis y alte-ración del ciclo celular	Agahi et al. 2021

Ante la evidencia de que el uso de carotenoides y otros compuestos bioactivos protegen la función mitocondrial y este es un orgánulo diana para la acción tóxica de muchas micotoxinas, en los últimos años se ha profundizado en la investigación de sus efectos combinados a nivel molecular. Estudios realizados por el grupo de investigación en el que se realiza esta tesis doctoral, sobre la toxicidad de AFB1 y OTA en la diferenciación neuronal de células SH-SY5Y, evidenciaron un efecto protector a nivel molecular del extracto de calabaza y suero de leche. Los marcadores neuronales dopamina y β-tubulina-III sufrieron una alteración severa, sobretodo a la exposición con OTA, que fue revertida por los compuestos funcionales. Asimismo, la expresión génica también se vio alterada por las micotoxinas, mientras que la adición de suero de leche fermentada y extracto de calabaza, mitigó estos efectos (Frangiamone et al., 2022).

La adición de luteína, zeaxantina y bayas de goji en diferentes concentraciones a modelos *in vitro* expuestos a BEA, protegió contra la citotoxicidad provocada por BEA en células Caco-2 y SH-SY5Y (Juan-García et al., 2019; Montesano et al., 2021). El pretratamiento de células ováricas (CHO-K1) con resveratrol antes de la exposición a BEA tuvo un efecto citoprotector y una reducción de los niveles de ROS y peroxidación lipídica, siendo el trans-resveratrol el diasterómero más eficiente (Mallebrera et al., 2015).

Por el contrario, el resveratrol no mostró efecto citoprotector en células Caco-2 frente a la coexposición de OTA y DON (Cano-Sancho et al., 2015). Tras el pretratamiento con hidroxitirosol, tres líneas celulares renales diferentes (MDCK, LLC-PK1 y RK13) evidenciaron la prevención de este compuesto frente al estrés oxidativo y la reducción de la proliferación celular inducido por la exposición a OTA (Crupi et al., 2020).

En este trabajo, se incluyen los dos estudios *in vitro* sobre exposición a micotoxinas y carotenoides, individualmente y en combinación, realizados sobre el modelo de BHE de células ECV304 diferenciadas para evaluar la expresión génica de genes clave en el funcionamiento de la mitocondria y concretamente, en la CTE. Estos trabajos se complementan con el estudio metabolómico realizado sobre el mismo modelo celular y que también se presenta en esta tesis.



**Figura 2.** Principales efectos neurotóxicos inducidos por micotoxinas (modificado de Nguyen et al. 2022). Línea sólida: evidencia suficiente como mecanismo de acción. Línea discontinua: hipótesis de mecanismo de acción.

## OBJETIVOS OBJECTIVES

## 2. OBJETIVOS

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral es la evaluación *in vitro* de los efectos tóxicos a nivel molecular producidos por micotoxinas y aportar información sobre sus mecanismos de acción.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1.** Descubrimiento de variantes de un solo nucleótido mediante el estudio bioinformático de los transcritos de ARN obtenidos mediante RNA-seq de la línea celular humana Jurkat expuesta a BEA y ENB individualmente.
- 2.** Análisis proteómico sobre el efecto en la mitocondria de la exposición combinada de BEA y ENB en células Jurkat.
- 3.** Análisis metabolómico de la exposición a micotoxinas y extracto de calabaza en el modelo *in vitro* de barrera hematoencefálica ECV304.
- 4.** Estudio de la expresión génica mitocondrial y la generación de especies reactivas del oxígeno tras la exposición a micotoxinas y extracto de calabaza en células ECV304 diferenciadas.

## 2. OBJECTIVES

The general objective of this Doctoral Thesis is to evaluate *in vitro* the toxic effects of various mycotoxins at molecular level and to provide information on their mechanisms of action.

In this sense, the following specific objectives were set:

- 1.** Discovery of single nucleotide variants by bioinformatic evaluation of RNA transcripts obtained by RNA-seq from Jurkat cells exposed to BEA and EN B individually.
- 2.** Proteomic analysis on the effect on mitochondria of BEA and EN B combined exposure in Jurkat cells.
- 3.** Metabolomic analysis on the exposure of mycotoxins and pumpkin extract to the *in vitro* blood-brain barrier model ECV304.
- 4.** Study of mitochondrial gene expression and reactive oxygen species generation following exposure to mycotoxins and pumpkin extract in ECV304 differentiated cells.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALS AND METHODS

## 3. MATERIALS AND METHODS

### 3.1. Transcriptomics

#### 3.1.1. Raw RNA-seq data acquisition

Raw RNA-seq data from previous published studies was used and detailed description of cell exposure and RNA extraction protocols can be found in Material and Methods section of the cited articles (Escrivá et al., 2018; Alonso-Garrido et al., 2018). Briefly, before contamination, Jurkat cells were plated in 12-well tissue culture plates at a density of  $5 \times 10^5$  cells/well. Cells were exposed for 24 h in standard conditions to 1.5  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , and 5  $\mu\text{M}$  for BEA or ENB in 1 % methanol and this solvent concentration as control (each condition  $n=3$ ) in maintenance medium. Total RNA of the control and exposed human T lymphocytes cells was isolated using Direct-zol™ RNA MicroPrep kit and treated with RNase free DNaseI (Zymo Research). The extracted RNA of each sample was firstly checked for quantity and quality using Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). The standard Illumina protocol was followed to develop RNA-seq libraries. The Illumina NextSeq 500 platform was used for sequencing. Then, one archive for each sample was obtained, 24 in total. RNA quality control and sequencing were carried out by the Genomics section of the Central Service for Experimental Research (SCIE, University of Valencia).

#### 3.1.2. Variant calling on RNA-seq data

##### 3.1.2.1. Pre-processing raw RNA-seq data

The quality control (QC) of reads was performed by FastQC software v0.11.8 (Andrews, 2010). The trimming was performed with FASTX-Toolkit v0.13N (Hannon, 2010), discarding the low quality bases from 5'- and 3'- extremes, low quality reads and the identical sequences in each file were collapsed into a single sequence (while maintaining reads counts).

RNA-seq variant calling was performed following two processing protocols: SNV-RNA-seq complementary pipeline (SNV-protocol 1) and the Genome Analysis Toolkit (GATK) Best Practices workflow (SNV-protocol 2).

### 3.1.3. Single nucleotide variant (SNV)-RNA-seq complementary pipeline

The SNV-protocol 1 was developed by the authors according to literature addressing differences in SNV by using RNA-seq data (Guo et al., 2017; Adetunji et al., 2019). The trimmed reads alignment was performed by STAR (Spliced Transcripts Alignment to a Reference) software v2.7, using as reference the Genome Reference Consortium Human Build 38 genome version (GRCh38). The Sequence Alignment Map files were transformed in their binary version, ordered and indexed using SAMtools software v1.10. The variant calling was performed by BCFtools v1.10.2. The BCFtools applied genotype probabilities calculated in the previous step to call functions that identified all possible polymorphisms and getting the Variant Call Format (VCF) files. These VCF files were inspected and the possible variants assessed through the Phred Quality Scores (Q) and their calculated p-values according to  $P=10^{-Q}/10$ . Then, Variant Tools (vt) software decomposed the original VCF files such that variants with multiple alleles were expanded into distinct variant records, as well as normalized the decomposed VCF, so that variants are left aligned and represented using the most parsimonious alleles. This software also validated the variants by checking in each VCF file the order and the reference sequence consistency. Finally, variants were annotated and filtered with the Ensembl Variant Effect Predictor software online with the following settings: 1) Setting RefSeq transcripts as reference database; 2) Selecting “Gene” + “Proteins” + “HGVS” identifiers; 3) excluding insertions and deletions (Indels); 4) excluding common variants + selecting variants in coding regions only; and 5) filtering by allele frequency  $< 0.05$  and keeping those variants which consequence was not ‘synonymous variant’. Results were visualized with the Integrative Genomic Viewer (IGV).

### 3.1.4. Genome Analysis Tool Kit Best Practices workflow

The SNV-protocol 2, followed the Genome Analysis Tool Kit workflow (GATK) for SNV and Insertion-Deletion calling on RNA-seq data, which are essentially a number of optional steps either upstream (preparatory) or downstream (filtering) of the variant calling process that were proven to increase the next generation sequencing (NGS)-derived variants quality. Briefly, the first major difference relative to the DNA-seq Best Practices was the mapping step. Thus, to achieve the highest sensitivity to SNVs, STAR was used in a 2-pass method which used the splice junctions detected in a first alignment to guide the final alignment. Next, using Picard, read groups were added and sorted, duplicates marked, and the index was created. In the next step, the GATK SplitNCigarReads specially developed for RNA-seq, which splits reads into exon segments (getting rid of Ns but maintaining grouping information) and hard-clip any sequences overhanging into the intronic regions was used. Variant calling was carried out using HaplotypeCaller and filtered as follows: 1) filter

clusters of at least 3 SNVs that are within a window of 35 bases between them; and 2) filter based on Fisher Strand values ( $FS > 30.0$ ) and QualByDepth values ( $QD < 2.0$ ). Finally, variants were also annotated and filtered with the VEP software online according with the same settings, visualized with the IGV (Robinson et al., 2011).

### 3.1.5. SNVs discovery assessing

In order to assess the protocols validity to find out SNVs in RNA-seq data, all DEGs were explored manually by  $FDR < 0.05$  and  $\log_{2}FC > |1|$ , as well as those with  $> 5000$  of total reads in the binary files generated in at least one of the protocols, by means of Integrative Genomic Viewer. This way it was checked if there were non-identified SNVs by the RNA-seq data processing protocols.

### 3.1.6. Comparison of two transcriptomic protocols

To assess the reproducibility of the previous transcriptomic findings, a new transcriptomic study was carried out with R software v4.0.3 (Core Team, 2017). BAM files obtained with STAR were used to generate an expression matrix using as reference the GRCh38 genome version. Annotation, normalization and statistical analyses to contrast differentiated expression between the different doses and controls, through genewise negative binomial generalized linear models with quasi-likelihood tests, were carried out according to the user guide of the edgeR package (Robinson et al., 2010). DEGs with false discovery rates ( $FDR < 0.05$ ) were considered significant. Venn diagrams and heat maps were plotted by using the Venerable and pheatmap packages (Kolde et al., 2019) respectively, to assess coincident DEGs between doses as well as coincident differently expressed genes with respect to previous studies (Escrivá et al., 2018; Alonso-Garrido et al., 2018).

## 3.2. Proteomics

### 3.2.1. Reagents

The reagent grade chemicals and cell culture components used: RPMI-glutamax medium, penicillin/streptomycin, Fetal Bovine Serum (FBS), phosphate buffer saline (PBS), BEA (783.95 g/mol, 97 % purity) and ENB (783.95 g/mol, 97 % purity) were purchased by Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Dimethyl sulfoxide (DMSO) and methanol were obtained from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Deionized water (resistivity < 18 MV cm) was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Stock solutions of BEA and ENB (1 mg/mL) were prepared in methanol and maintained at -20 °C. Final concentrations of mycotoxins in the assay were achieved by their dilution in the culture medium. The final DMSO concentration in the medium was 0.5 % (v/v).

### 3.2.2. Cell culture and mycotoxins exposure

Jurkat T-cells derived from human T lymphocyte peripheral blood were maintained in RPMI-glutamax medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 10 % (v/v) FBS inactivated. Incubation conditions were pH 7.4, 37 °C under 5 % CO<sub>2</sub> and 95 % air atmosphere at constant humidity. Culture medium was changed every two days. Absence of mycoplasma was checked routinely using the Mycoplasma Stain Kit (Sigma Aldrich, St Louis Mo. USA). Before contamination, cells were grown independently to a density of 2 × 10<sup>7</sup> cells/flask. Each flask had reached different pass number to assure three independent biological samples per concentration used plus the vehicle. Jurkat T-cells were then co-exposed for 24 h to BEA-ENB (0.01 μM, 0.1 μM and 0.5 μM) in 0.5 % DMSO and the solvent concentration as control (each condition n=3) in maintenance medium and standard conditions. Mycotoxin concentrations were chosen to simulate a realistic scenario (Table 5).

**Table 5.** Relation between mycotoxin food contamination levels and plasma concentration (Devreese et al., 2013)

PLASMA CONCENTRATION (μM)	FOOD CONTAMINATION (μg/kg)	
	BEA	EN B
0,01	7,8	6,4
0,1	78	64
0,5	390	320

### 3.2.3. Mitochondria enriched extracts

After mycotoxin exposure, cells were washed with PBS and each sample was transferred to a 2 ml microcentrifuge tube. Then, Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo Scientific™) was used to isolate intact mitochondria by a non-mechanical, reagent-based method. Following the protocol, 800 μL of Mitochondria Isolation Reagent A were added to 2 × 10<sup>7</sup> cell pellet. Then, each tube was vortexed at medium speed for 5 s and incubated on ice for exactly 2 min. At that point, 10 μL of Mitochondria Isolation Reagent B were added, each sample tube was vortexed and introduced in ice. The third reagent addition was 800 μL of Mitochondria Isolation Reagent C, followed by tube inversion to mix. Then, centrifugation at 700×g for 10 min at 4 °C and supernatant transfer to a new tube. A second centrifugation was carried out at 12,000×g for 15 min at 4 °C. Finally, 500 μL addition of Mitochondria Isolation Reagent C to the pellet, and centrifugation at 12,000×g for 5 min. Mitochondrial pellets were maintained at -80 °C until protein extraction.

### 3.2.4. Sample preparation for proteomics

Mitochondrial protein pellets were resolved in 100 μL of buffer (8 M urea/2 M thiourea), homogenized by vortexing at 3000 rpm (ThermoMixer® C, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and sonified three times for 3 s on ice, each with nine cycles (SonoPlus GM 4100 ultrasonicator, BANDLIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany). Afterwards, the protein extract was centrifuged for 30 min at 4 °C and 13000 g. The protein concentration of the supernatant was determined using a Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Sample aliquots were stored at -80 °C.

### 3.2.5. Preparation of peptide extracts for quantitative proteomics

Peptide extraction was performed as described (Iuga et al., 2014). In brief, sample aliquots of about 2 μg were diluted with 20 mM ammonium bicarbonate until a final concentration of less than 1 M urea was reached. Following reduction with 2.5 mM DTT (1 h at 60 °C) and alkylation with 10 mM iodoacetamide (30 min at 37 °C), samples were digested with trypsin (1:50) overnight at 37 °C for 18 h. The reaction was stopped with acetic acid at a final concentration of 1 % and peptide mixtures were desalted on C-18 reverse phase material (ZipTip μ-C18, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Peptides were eluted in 50 and 80 % ACN each in 1 % acetic acid. Pooled eluates were concentrated to 2 μL in a vacuum concentrator (SPD1010 SpeedVac™ System, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) for 10 min at room temperature and dissolved in 0.1 % acetic acid:

acetonitrile (98:2 v/v) to a final concentration of 0.1 µg/µL. Technical replicates were obtained applying two independent extractions per biological sample.

### 3.2.6. Label-free mass spectrometry and data analysis

Two technical replicates per biological sample were subjected to nanoLC-UDMSE analysis (ACQUITY UPLC M-Class System coupled with SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometer with NanoLockSpray Exact Mass Ionization Source, Waters Corp, Massachusetts, USA). Tryptic digested peptides were separated on ACQUITY UPLC M-Class T3 Column Reversed-Phase 1.8 µm Spherical Silica, 75 µm × 150 mm coupled with ACQUITY UPLC M-Class Reversed-Phase 5 µm Spherical Silica, 180 µm × 20 mm trap column (Waters Corp, Massachusetts, USA). A 105 min nonlinear gradient of 7 %–60 % acetonitrile 0.1 % formic acid at a flow rate of 300 nL/min was implemented. Data was acquired in independent acquisition mode using the MassLynx™ Software Version 4.1 (Waters Corp, Massachusetts, USA), a programmed feature for the measurement of parent- and product ions by switching between low energy (MS) and elevated energy (MSE).

LC-UDMSE data were processed with Progenesis Q1 for proteomics v2.0 (Waters Corp, Massachusetts, USA) for automated peak picking and alignment. Spectra was searched using the built-in search engine against a Uniprot/Swissprot database (09/2017) limited to human entries, enzyme specificity was trypsin allowing a maximum of 1 missed cleavage, carbamidomethylation of cysteine as fixed and oxidation of methionine as a variable modification. Search tolerance parameters were set for a false discovery rate of below 4 % and proteins were considered significantly identified if the following ion matching requirements were passed: fragments/peptide ≥1, fragments/protein ≥3 and peptides/protein ≥1. Protein relative quantification was performed using non-conflicting peptides.

### 3.2.7. Protein functional analysis

Gene ontology (GO) analysis was used to get more comprehension on the biological significance of the 340 regulated proteins with exploring the relationship between the biological terms and associated genes. The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.8 (Huang et al., 2009) and the Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER) v14.0 classification system were used to classify proteins in order to enable high-throughput analysis (Mi et al., 2019). While DAVID recognized all proteins, PANTHER found 259.

## 3.3. Metabolomics

### 3.3.1. Reagents

Cell culture components including Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (1X) supplemented with GlutaMAX, DMEM F-12 nutrient mixture [DMEM/F-12 (1:1) (1X)], PBS, FBS, trypsin-EDTA (0.05 %), streptomycin, and penicillin were all of the Gibco brand (Fisher Scientific, Loughborough, UK). Dimethyl sulphoxide (DMSO) (99.7 %) was supplied by Fisher Bio Reagents (Geel, Belgium) and phenol red by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Mycotoxin standards – ZEA (≥ 99 % purity), OTA (≥ 98 % purity), and BEA (≥ 97 % purity) – were supplied by Sigma-Aldrich. Stock solutions at 1 mg/mL of each mycotoxin were prepared in methanol and stored in darkness at -20 °C until analysis. They were used at a working concentration of 100 nmol/L as described elsewhere (Alonso-Garrido et al., 2020). Methanol was evaporated with nitrogen flux and then the standards diluted in DMSO.

Carotenoid extract from pumpkin pulp was provided by Nicola Marchetti from the University of Ferrara (Bergantin et al., 2018). The working concentration of 500 nmol/L is based on beta-carotene as reference carotenoid to simulate a real-life scenario.

Solvents for high-performance liquid chromatography (HPLC), namely acetonitrile (Optima LC/MS grade) was acquired from Fisher Scientific, deionised water (resistivity >18 MΩ/cm) was obtained with a Milli-Q SP® Reagent Water System (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA), and formic acid (reagent grade ≥95 %) was supplied by Sigma-Aldrich.

### 3.3.2. Cell culture

The function of the blood-brain barrier was simulated with an *in vitro* model based on human umbilical vein endothelial (ECV304) and rat glioma (C6) cell lines (Yuan et al., 2016). C6 cells were maintained in DMEM/F-12 medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 10 % (v/v) FBS, and 2 mmol/L L-glutamine. ECV304 cells were kept in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 10 % (v/v) FBS. Culture medium was changed every two days. Incubation conditions were: pH 7.4, 37 °C, atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>, and constant relative humidity of 95 %.



C6 cells were added to a 24-well PET plate (Falcon) at a density of  $5 \times 10^4$  cells/mL and incubated for 2–3 h to attach. They provide an appropriate environment for ECV304 cells to differentiate but make no part of the exposure experiment. Then we placed the Millicell-PET culture inserts with a polyethylene terephthalate membrane (0.4  $\mu$ m pore size, surface 0.3 cm<sup>2</sup>; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) into the wells and covered them with ECV304 cells at a density of  $5 \times 10^4$  cells/mL. This ECV304/C6 co-culture was maintained under incubation conditions for 9–10 days until the barrier was formed.

### 3.3.3. Monolayer integrity checks

From day 4 of co-culture, transepithelial/transendothelial electrical resistance (TEER) across the ECV304 cell monolayer with epithelial voltohmmeter (Millicell® ERS-2, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) was measured to check the Blood Brain Barrier (BBB) integrity (Yuan et al., 2016). The cell monolayer had to be preconditioned for the measurements in HBSS for 30 min by removing the culture medium by aspiration and replacing it with 200  $\mu$ L of HBSS in the apical compartment and with 1300  $\mu$ L in the basal compartment. After TEER measurement, HBSS was aspirated and replaced with fresh C6 cell medium. The TEER value was calculated using the following formula:

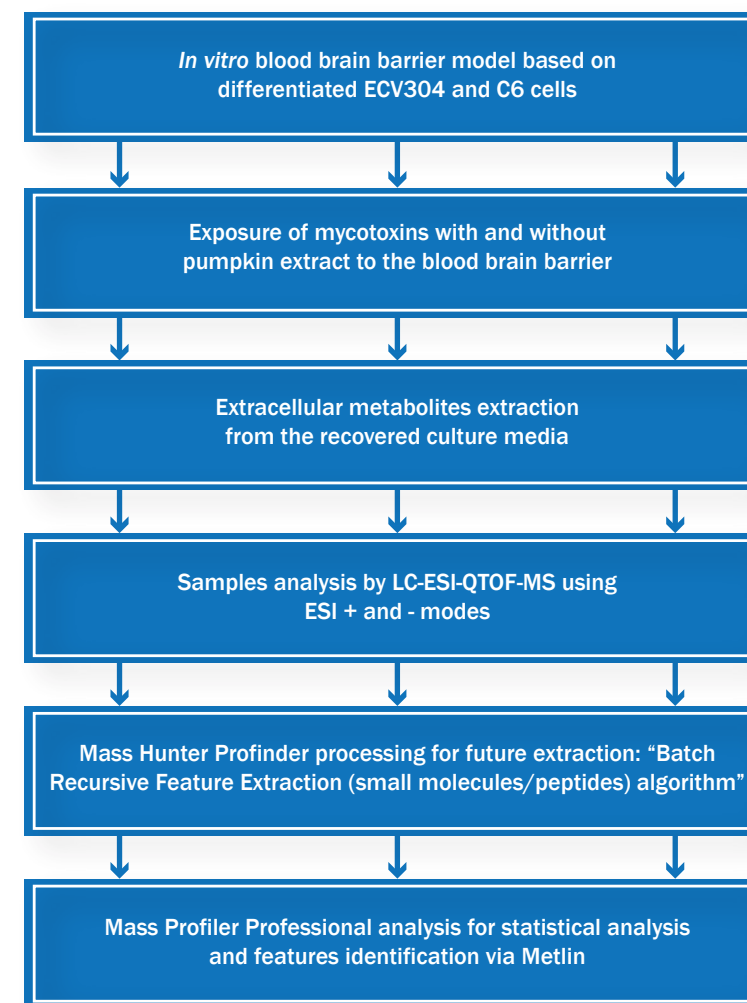
$$\text{TEER} = (\text{R}_{\text{total}} - \text{R}_{\text{control}}) * A$$

where  $R_{\text{total}}$  is the resistance of the cell monolayer,  $R_{\text{control}}$  the resistance of blank or control inserts, and  $A$  is the Millicell insert surface. TEER reached its maximum around day 9–10 of the experiment. After the exposure, samples were collected, HBSS added, and TEER measured again to check for barrier damage. No damage was found regardless of treatment.

Monolayer integrity was also verified with phenol red permeation on three control inserts. The medium was aspirated and the inserts washed three times with PBS and transferred to a new plate where 1300  $\mu$ L of PBS were added to the basal compartment. The apical compartment received 200  $\mu$ L of a phenol red solution in PBS at a concentration of 42  $\mu$ mol/L, and the plate was incubated at 37 °C for one hour. Then, the content of the basal compartment was collected, adjusted to pH 11 with a solution of NaOH and the amount of phenol red was measured with a spectrophotometer at 558 nm in the basal compartment. The finding of < 6 % of phenol red in the basal compartment evidenced the integrity of the cell monolayer.

### 3.3.4. Blood Brain Barrier exposure experiment

After we confirmed ECV304 cell confluence with TEER around day 9 or 10, we could proceed with exposing the cells to mycotoxins. Cells were first incubated at 37 °C for 30 min in 800  $\mu$ L HBSS added to the basal compartments in a new 24-well plate by transferring the ECV304 cell monolayer to this new plate to exclude C6 cells from exposure. This step is important in order to exclude metabolites not resulting from ECV304 cell exposure. After this preconditioning, the apical compartments of the inserts were exposed to a 400  $\mu$ L mixture of HBSS and OTA, ZEA, or BEA alone or OTA+ZEA (1:1) or OTA+ZEA+BEA (1:1:1) combinations (100 nmol/L each) with DMSO at a final concentration of 0.5 %.



**Figure 3.** Workflow used to assess the metabolic profile of the blood-brain barrier model exposed to mycotoxins with and without pumpkin extract. BBB – blood brain barrier; LC-ESI-QTOF-MS – liquid chromatography-electrospray ionisation quantitative time of flight.

All these mycotoxins were also assayed in parallel with the pumpkin extract at the beta-carotene concentration of 500 nmol/L as reference carotenoid. In control samples the cells were incubated with 0.5 % of DMSO in HBSS. In positive control samples the cells were incubated with 500 nmol/L of beta-carotene in HBSS diluted with 0.5 % of DMSO. All analyses were done in triplicate on cell cultures at passages between the P20 and P30.

After 2-hour exposure at 37 °C simulating mycotoxin transfer across the BBB, the media of the apical and basal compartments were collected separately for each insert/ well and kept at -70 °C until metabolite extraction (Fig. 3).

### 3.4. Differential Gene Expression analysis of mitochondrial genes after mycotoxins exposure with and without pumpkin extract

#### 3.4.1. Reagents

The reagent grade chemicals and cell culture components used, DMEM/F-12 and DMEM medium (Thermo Fisher, USA), penicillin/streptomycin, PBS, AFs (AF B1, AF B2, AF G1, AF G2), BEA, OTA, ENs (EN A, EN A1, ENB, ENB1) and ZEA were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). DMSO and methanol were obtained from Fisher Scientific (Madrid, Spain). Deionised water (resistivity <18 MV cm) was obtained using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA). Stock solution of mycotoxins at 1000 ppm was prepared in methanol and maintained at -20 °C. Evaporation of mycotoxins was performed using nitrogen flux and diluted in DMSO. Pumpkin extract (pumpkin) was obtained from *C. maxima* (var. *Delica*) thanks to N. Marchetti (Department of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, University of Ferrara) and kept at -80 °C (Bergantin et al., 2018). Pumpkin was also dissolved in DMSO for cell treatment. Final concentrations of mycotoxins (100 nM) and pumpkin (500 nM) in the assay were achieved by their dilution in the culture medium. The final DMSO concentration in the medium was 1 % (v/v).

**Table 6.** HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS absolute quantification of carotenoids in *C. Maxima* (var. *Delica*).

CAROTENOID	ABSOLUTE QUANTIFICATION
( $\mu$ /g of fresh matter)	9.09 $\pm$ 0.99
astaxanthin	2.54 $\pm$ 0.99
antheraxanthin	4.34 $\pm$ 0.74
zeaxanthin	16.99 $\pm$ 3.08
lutein	37.12 $\pm$ 30.08
lycopene	19.25 $\pm$ 2.69
$\beta$ -carotene	49.29 $\pm$ 3.78

#### 3.4.2. Cell culture

ECV304 cells were initially thawed from liquid nitrogen, plated, grown to confluence, trypsinized and suspended in culture medium. They were maintained in DMEM medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 10 % (v/v) FBS inactivated and amphotericin B 0.1 % (Gibco™). Absence of mycoplasma was checked routinely using the Mycoplasma Stain Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA). Culture medium was replaced daily every 2 days from day 4 and the co-culture was maintained at 37 °C, with a relative humidity of 90 % and the atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>. ECV304 has been described as an appropriate mono-culture model to assess the BBB, demonstrating tighter barrier function than other endothelial cell lines. In combination with chromatography-mass spectroscopy analysis, is a fast and successful technique to screen bioactive compounds crossing the BBB (Yang et al., 2018).

**Table 7.** ECV304 differentiated cells exposure conditions using 0.1 % DMSO in HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution.

SAMPLE	MYCOTOXIN (nM)	β-CAROTENE (nM)
Control	-	-
AFs (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2)	100 (1:1:1:1)	
BEA	100	-
ENs (ENA, ENA1, ENB, ENB1)	100 (1:1:1:1)	
BEA-ENs (ENA, ENA1, ENB, ENB1)	100 (1:1:1:1:1)	
OTA	100	-
ZEA	100	-
AFs-ENs	100 (1:1)	
OTA-ZEA	100 (1:1)	-
BEA-OTA-ZEA	100 (1:1:1)	-
Control-pumpkin	-	500
AFs-pumpkin	100	500
BEA-pumpkin	100	500
BEA-ENs-pumpkin	100 (1:1:1:1:1)	500
OTA-pumpkin	100	500
ZEA-pumpkin	100	500

AFs-ENs-pumpkin	100	500
OTA-ZEA-pumpkin	100 (1:1)	500
BEA-OTA-ZEA-pumpkin	100 (1:1:1)	500

### 3.4.3. Primer design and Quantitative Real-Time PCR assays

Gene-specific primers were designed using Primer-BLAST (Ye et al., 2012) using default criterion of the software with amplified products ranging from 75 to 150 bp and T<sub>m</sub> at 59 °C. Primer sequences from Escrivá et al., (2018) were used in RT-qPCR analyses. Standard curve by RT-qPCR was performed for all primer pairs and a single amplification product for each gene was obtained by the melting curve assay. Primer amplification efficiency was determined from standard curve generated by serial dilution of cDNA (5 fold each) for each gene in triplicate. Correlation coefficients (R<sup>2</sup> values) and amplification efficiencies (E) for each primer pairs were calculated from slope of regression line by plotting mean C<sub>q</sub> values against the log cDNA dilution factor in StepOne software (Table 8). Realtime amplification reactions were performed in 96 well plates using SYBR Green detection chemistry and run in triplicate on 96-wells plates with the StepOne Plus Real-time PCR machine (Applied Biosystems). Reactions were prepared in a total volume of 10 µL containing: 3 µL of 1:5 diluted template, 1 µL of each amplification primer (5 µM) and 5 µL of 2x Fast SYBR Green (Applied Biosystems). Non-template controls (NTC) were also included for each primer pair, replacing the template by water DNase and RNase free from the RNA extraction kit (ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System, Promega). The cycling conditions were set as default: initial denaturation step of 95 °C for 5 min to activate the Taq DNA polymerase, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 59 °C for 15 s and elongation at 72 °C for 30 s. The melting curve was generated by heating the amplicon from 60 to 90 °C. Baseline, threshold cycles (C<sub>t</sub>) and graphs were automatically determined using the StepOne Plus Software version 2.3 (Applied Biosystems). Three technical replicates were performed for each condition. Every experiment was performed according to MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) guidelines (Bustin et al., 2009).

**Table 8.** Primers for RT-qPCR analysis. \*Housekeeping gene. F, forward primer. R, reverse primer.

GENE	SEQUENCE 5' - 3'	AMPLICON (bp)	EFFICIENCY (%)	LINEARITY (R2)
MT-ND2	F: CGTAAGCCTTCTCCTCACTC R: CAACTGCCTGCTATGATGGA	51	141.3	0.997
MT-ND3	F: CCCTCCTTTTACCCCTACCA R: GCCAGACTTAGGGCTAGGAT	100	82.0	0.996
MT-ND4	F: CACACGAGAAAACACCCTCA R: AAACCCGGTAATGATGTCGG	82	151.9	0.992
MT-ND4L	F: CCCACTCCCTTAGCCAAT R: GGCGGCAAAGACTAGTATGG	53	121.0	0.993
MT-ND5	F: CATCCCCCTTCCAAACAACA R: GTCCTAGGAAAGTGACAGCG	69	125.2	0.991
MT-C01	F: TCATAATCGGAGGCTTTGGC R: GTTGTTTATGCGGGGAAACG	80	121.1	0.992
MT-C03	F: CTTCCACTCCATAACGCTCC R: GTTACATCGCGCCATCATTG	78	129.6	0.991
MT-ATP6	F: CTAGAAATCGCTGTCGCCTT R: ATGTGTTGTCGTCAGGTAG	76	76.4	0.985
MT-ATP8	F: CCCTGAGAACC AAAATGAACGA R: GATTGTGGGGCAATGAATGA	56	112.9	0.996
MT-RNR2	F: GTAAATCGGAATGGACCCCC R: CTGCTGGGGGATTTCTTGT	93	85.5	0.991
MRPL12	F: GATGGGTGGTGTGATGCTG R: TGTCCGTTCTTCGCTATGG	88	123.8	0.992
OSGIN1	F: TCTTTGATGCCCTTCTACGC R: CGACTTCATGTTCCCCCAA	53	142.9	0.980

SRXN1	F: GGTCTAGGGGAAGAGGTGTT R: CTTGGTTTTTCAGAAGCCCCT	141	137.5	0.992
TXNIP	F: GTGAAGGTGATGAGATTTC R: CTCTGACTGATGACAACCTC	146	125	0.985
UCP2	F: AAAGGTCCGATTCCAAGCTC R: TTTGGTATCTCCGACCACCT	53	122.5	0.99
S18*	F: CGGCTACCACATCCAAGGAA R: GCTGGAATTACCGCGGCT	100	101.5	0.994

### 3.4.4. Intracellular ROS generation

Early intracellular ROS production was monitored in ECV304 according to H2-dichlorofluorescein diacetate (H2-DCFDA) probe. DCFHDA enters the cells, followed by deacetylation by intracellular esterases resulting in H2-DCFDA, oxidized by ROS species to the highly fluorescent dichlorofluorescein. Briefly,  $2 \times 10^4$  cells/well were seeded in a 96-well black culture microplate with 200  $\mu$ L/well medium and differentiated for 9 days to form the monolayer. Then, medium was aspired and fresh medium (20 mL) loaded (200  $\mu$ L/well) with 20  $\mu$ M H2-DCFDA for 20 min. Subsequently, H2-DCFDA was aspired and exposed to every condition described at (Table 3). Increases in fluorescence were measured on a Wallace Victor2, model 1420 multi-label counter (PerkinElmer, Turku, Finland), at intervals of 2, 4, 6, h at excitation/emission wavelengths of 485/535 nm. Results are expressed as increase in fluorescence respect to control. Determinations were performed in experiments with 24 replicates for each condition. These experiments were conducted for all mycotoxins and mixtures, but AFs, AFs-ENs with and without pumpkin extract.

Statistical analysis was performed with SPSS 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) using T-student test. For statistically significant differences  $p \leq 0.05$  was considered.

## RESULTADOS RESULTS

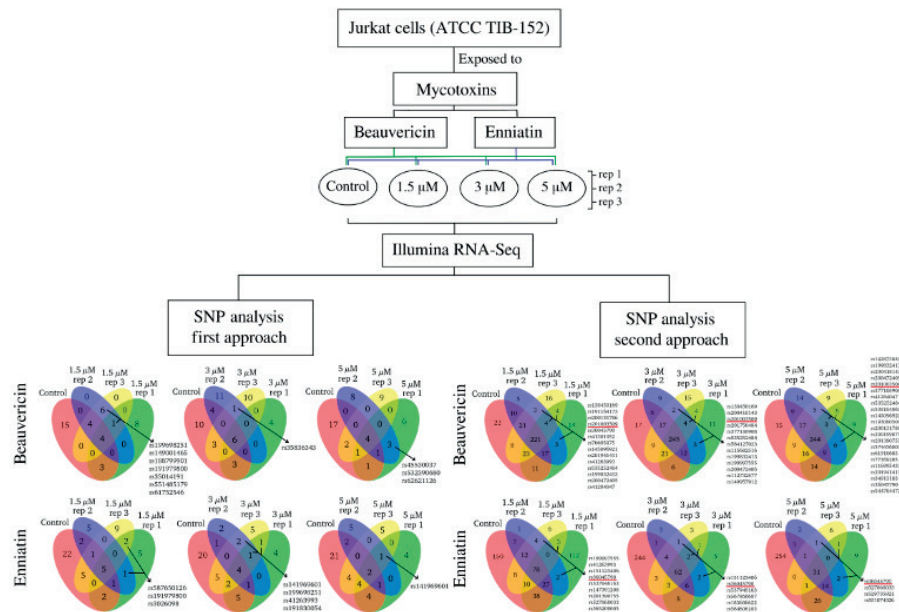
## 4. RESULTS

### 4.1. Assessment of Single Nucleotide Variant in RNA-seq data from human cells exposed to BEA and ENs mixture

#### 4.1.1. Variant calling on RNA-seq data

In this study, two RNA-seq pipeline approaches and their variant calling results were compared: SNV-RNA-seq complementary pipeline (SNV-protocol 1) and GATK Best Practices workflow (SNV-protocol 2). Discovered SNVs are shown in Figure 3. Each experiment was performed in triplicate for each toxin. In each Venn diagram the control was represented in only one area, which is the sum of all SNVs reported in the three controls: 26 SNVs in total for BEA in SNV-protocol 1 and 333 SNVs reported by SNV-protocol 2; For ENB 38 SNVs in total by SNV-protocol 1 and 330 SNVs reported by SNV-protocol 2 (Fig. 4). Each replica for 1.5  $\mu$ M, 3  $\mu$ M, and 5  $\mu$ M, was represented in a separate area, to select only the SNVs reported in at least 2 replicas in the same concentration, but not in controls (black arrows in the diagrams). The list of SNVs in common was verified in the BAM file using Integrative Genome Viewer, many of them did not meet the parameters of being present in at least 20% of the reads or sequence depth, thus were discarded.

Only the SNVs rs201003509 (Chromosome 13, CUL4A gene) in BEA exposed Jurkat cells and the rs36045790 (Chr 2, EMILIN1 gene) in ENB were found in the differentially expressed genes in all doses compared to controls by means of SNV-protocol 2 (red line, Fig. 4). Both SNVs were missense variant changing the guanine (G) for an adenine (A) or thiamine (T), without reported clinical significance. SNV-RNA-seq complementary pipeline did not display any SNV coincident with the three concentrations used per mycotoxin. Real-time PCR analysis was performed to detect SNVs rs201003509 and rs36045790, however the in silico results were not validated.



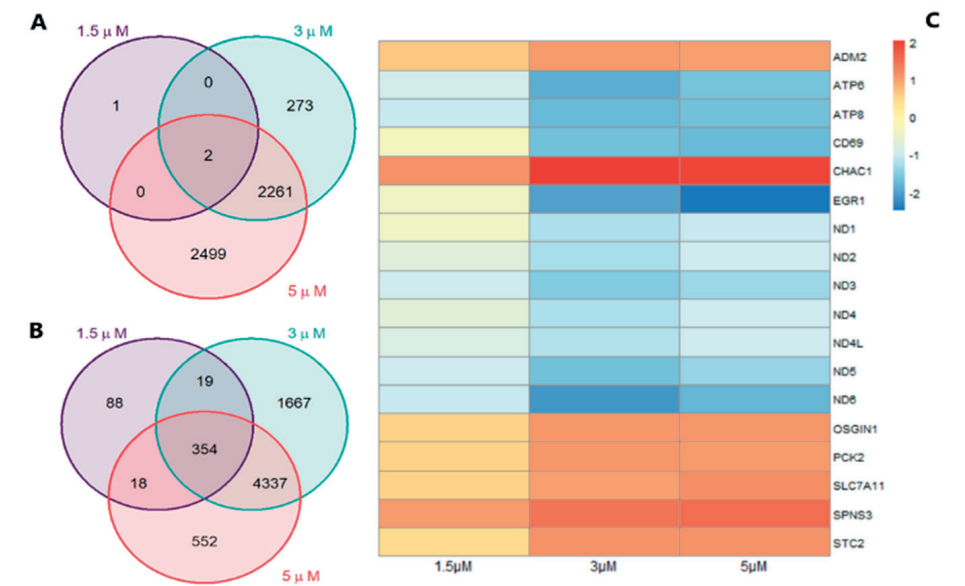
**Figure 4.** SNVs discovery by using two RNA-seq data processing protocols. First approach: SNV-protocol 1. Second approach: SNV-protocol 2. Red line: SNVs selected for experimental validation by real time PCR.

#### 4.1.2. SNVs discovery assessing

In order to identify potential SNVs and compare them with the SNVs obtained through the two discovery protocols, a total of 42 DEGs with  $\log_{2}FC > |1|$  and  $FDR < 0.05$  (featured in bold in Supplementary Tables S1 and S2), all of them in ENB samples, have been inspected manually with IGV, as well as 141 genes with  $>5000$  of total reads (Supplementary Table S3). Several SNVs were identified but they were not previously detected by the bioinformatics protocols. Supplemental Figures S1 to 3 show the most evident SNVs observed with IGV by using the BAM files generated from both protocols. Thus, SNVs in the positions: chrX:154,432,367 (ATP6AP1 gene, non-reported SNV, C changes to T), chr19:10,137,193 (DNMT1 gene, reported rs769675693 SNV, G changes to A or C), and chr1:19,104,200 (UBR4 gene, non-reported SNV, A changes to G), were recognized.

#### 4.1.3. Transcriptomic study with the new protocols

Regarding gene expression, only 2 overlapped DEGs were found in BEA samples in the three concentrations but none of them were coincident with former studies which identified up to overlapped 43 DEGs (Escrivá et al., 2018). However, we identified 354 overlapped DEGs in the three ENB concentrations used, with 147 matches with respect to the 245 DEGs found in the previous results (Alonso-Garrido et al., 2018) (Fig. 5A and 5B).



**Figure 5.** A) Venn diagrams plotting the coincident DEGs considering each BEA exposure condition; B) Venn diagrams plotting the coincident DEGs considering each ENB exposure condition; C) Heat Map plotting the  $\log_{2}FC$  of the most relevant DEGs found in ENB samples

Some of these 147 coincident DEGs reached a fold change logarithm ( $\log_{2}FC > |1|$ ) (Figure 4C) in at least one ENB dose (Table 9) and 17 of them were related to the electron transport chain.

**Table 9.** Differentially expressed genes with logFC > |1| in at least one dose in ENB exposed samples and coincident with former studies. FDR: false discovery rate; logFC: fold change logarithm.

GENE	1.5 $\mu$ M		3 $\mu$ M		5 $\mu$ M	
	LogFC	FDR	LogFC	FDR	logFC	FDR
ADM2	0.613	<0.001	1.043	<0.001	0.990	<0.001
ATP6	-0.925	<0.001	-1.908	<0.001	-1.644	<0.001
ATP8	-1.031	<0.001	-1.751	<0.001	-1.662	<0.001
CD69	-0.305	0.046	-1.662	<0.001	-1.753	<0.001
CHAC1	1.134	<0.001	2.003	<0.001	1.918	<0.001
EGR1	-0.409	0.023	-2.048	<0.001	-2.505	<0.001
ND1	-0.416	0.001	-1.237	<0.001	-1.042	<0.001
ND2	-0.706	<0.001	-1.255	<0.001	-1.015	<0.001
ND3	-0.935	<0.001	-1.549	<0.001	-1.369	<0.001
ND4	-0.677	<0.001	-1.240	<0.001	-0.981	<0.001
ND4L	-0.821	<0.001	-1.153	<0.001	-1.007	<0.001
ND5	-0.973	<0.001	-1.659	<0.001	-1.403	<0.001

ND6	-1.030	<0.001	-2.113	<0.001	-1.809	<0.001
OSGIN1	0.550	0.007	1.073	<0.001	1.069	<0.001
PCK2	0.538	<0.001	1.060	<0.001	1.030	<0.001
SLC7A11	0.528	<0.001	0.975	<0.001	1.173	<0.001
SPNS3	1.029	<0.001	1.455	<0.001	1.533	<0.001
STC2	0.468	<0.001	1.109	<0.001	1.121	<0.001

## 4.2. Mitochondrial proteomics profile points to oxidative phosphorylation as the main target for beauvericin and enniatin B mixture

### 4.2.1. Proteomics analysis

The analysis of mitochondria enriched extracts from Jurkat cells exposed to three concentrations of BEA:ENB (0.01–0.1–0.5  $\mu$ M) and their control DMSO 0.5 % was performed by gel-free shotgun proteomic approach. By identifying features across all LC-MS/MS runs, analysis in the Progenesis Q1 for proteomics software package allowed identification of 1821 unique proteins at 1 % false discovery rate (peptide level). Subsequently, analyses were confined to 340 proteins (fold change  $\geq$  1.5 and Anova p-value  $\leq$  0.05) which could thus also be used for the stringent assessment of quantitative difference between control and treated groups. Moreover, from 115 of these proteins with altered abundance, 54 proteins displayed higher and 61 lower levels in treated groups in comparison to control. Among the proteins showing the same trend (increasing or decreasing) with mycotoxins mixtures concentration, the most abundant protein was mitochondrial import receptor subunit TOM7 homolog (TOMM7), meanwhile transmembrane protein 263 (TMEM263) had the lowest level. The remaining 225 proteins have altered levels in-between treated groups depending on mycotoxins concentrations used, but did not follow any pattern relative to control.

**Table 10.** Functional annotation chart of the 5 most significant terms using DAVID resources of the 340 proteins selected after BEA:ENB exposure in the categories Uniprot keyword, Uniprot sequence feature and KEGG.

UNIPROT KEYWORD				
Term	Count	%	P-Value	Benjamini
Acetylation	166	48.8	2.80E-43	8.90E-41
Mitochondrion	83	24.4	2.40E-31	3.70E-29
Transit peptide	45	13.2	1.10E-18	1.10E-16
Phosphoprotein	212	62.4	5.30E-17	4.20E-15
Mitochondrion inner membrane	28	8.2	7.30E-14	4.60E-12

UNIPROT SEQUENCE FEATURE				
Term	Count	%	P-Value	Benjamini
transit peptide:Mitochondrion	41	12.1	3.50E-17	3.10E-14
nucleotide phosphate-binding region:GTP	26	7.6	7.80E-11	3.50E-08
nucleotide phosphate-binding region:NAD	11	3.2	7.90E-07	2.40E-04
binding site:NAD	8	2.4	2.90E-05	6.40E-03
short sequence motif:Effector region	9	2.6	2.70E-04	4.80E-02

KEGG				
Term	Count	%	P-Value	Benjamini
Oxidative phosphorylation	24	7.1	3.4E-13	7.8E-11
Parkinson's disease	23	6.8	1.40E-11	1.70E-09
Huntington's disease	24	7.1	9.90E-10	7.70E-08
Alzheimer's disease	22	6.5	2.60E-09	1.50E-07
Metabolic pathways	63	18.5	7.30E-08	3.40E-06

Interestingly, DAVID analysis (Table 10) revealed that from 83 mitochondrion related proteins, 28 belonged to its inner membrane. Concerning oxidative phosphorylation pathway, 7 proteins were found altered in complex I, 1 in complex II, 2 in complex III, 2 in complex IV and 10 in complex V.

Regarding PANTHER overrepresentation test results, molecular function and biological process GO terms were obtained (Table 11). ATP synthesis coupled proton transport was the most significant biological process and protein transmembrane import into intracellular organelle was the most enriched.



**Table 11.** PANTHER's GO-slim results using 340 proteins selected after BEA:ENB exposure by Fisher's Exact (p value <0.05) test type, false discovery rate (FDR) as correction, fold enrichment > 10.

PANTHER GO-Slim Biological Process	Homo sapiens - REFLIST (20996)	Input list (259)	Expected	over / under	Fold Enrichment	Raw p-value	FDR
mitochondrial electron transport, ubiquinol to cytochrome c (GO:0006122)	8	3	0.1	+	30.4	2.75E-04	1.90E-02
protein stabilization (GO:0050821)	13	3	0.16	+	18.71	8.91E-04	4.70E-02
mitochondrial translation (GO:0032543)	22	5	0.27	+	18.42	1.68E-05	3.01E-03
mitochondrial gene expression (GO:0140053)	26	5	0.32	+	15.59	3.39E-05	3.38E-03
protein targeting to mitochondrion (GO:0006626)	31	5	0.38	+	13.08	7.15E-05	6.12E-03
ATP synthesis coupled proton transport (GO:0015986)	45	7	0.56	+	12.61	3.08E-06	1.85E-03
energy coupled proton transport, down electrochemical gradient (GO:0015985)	45	7	0.56	+	12.61	3.08E-06	1.38E-03
tricarboxylic acid cycle (GO:0006099)	26	4	0.32	+	12.47	4.60E-04	2.95E-02
mitochondrial ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042775)	28	4	0.35	+	11.58	5.92E-04	3.67E-02

oxidative phosphorylation (GO:0006119)	42	6	0.52	+	11.58	2.47E-05	3.17E-03
mitochondrial transmembrane transport (GO:1990542)	29	4	0.36	+	11.18	6.68E-04	4.00E-02
ATP synthesis coupled electron transport (GO:0042773)	29	4	0.36	+	11.18	6.68E-04	3.87E-02
ATP metabolic process (GO:0046034)	44	6	0.54	+	11.05	3.13E-05	3.31E-03
purine ribonucleotide metabolic process (GO:0009150)	54	7	0.67	+	10.51	9.16E-06	2.74E-03
fatty acid catabolic process (GO:0009062)	31	4	0.38	+	10.46	8.38E-04	4.56E-02
aerobic respiration (GO:0009060)	39	5	0.48	+	10.39	1.90E-04	1.37E-02
ribonucleotide metabolic process (GO:0009259)	55	7	0.68	+	10.32	1.02E-05	2.62E-03

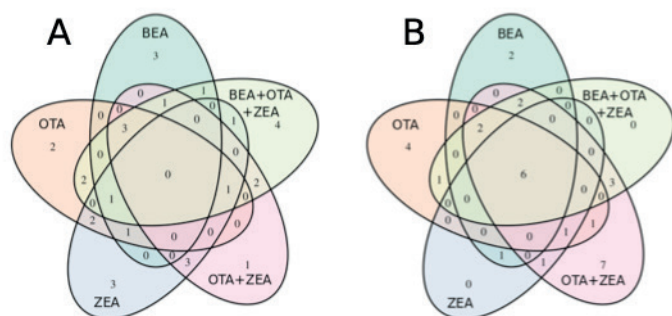
#### 4.2.2. Transcriptional Vs. proteomic profile of Jurkat cells exposed to BEA and ENB

Comparing results found by Escrivá et al., (2019), using akin exposure conditions but a RT-qPCR transcriptional approach some similitudes arisen. Focusing only in the 0.1 and 0.5  $\mu$ M BEA:ENB conditions shared by both studies, HSPA5 and MRPL12 were identified and analyzed, however they were only statistically significant at proteomic level. Other statistically significant gene expression in RT-qPCR was found for AK4, CCNG2, MT-ATP8, MT-CO1, MT-ND2, MT-ND5 and MT-RNR2 although they could not be confirmed by proteomics (Escrivá et al., 2019).

### 4.3. The role of pumpkin extract against mycotoxin damage in the blood brain barrier *in vitro*: metabolomic approach

#### 4.3.1. Differential analysis of metabolites abundances

Metabolomics analysis identified 181 features in the basal phase, of which 159 were statistically significant compared to control. Among these features, 74 were found in the samples not treated with the pumpkin extract and 90 in samples with this extract. Twenty-five features were reported in both the organic and aqueous phase in the same treatment group. Fig. 6 shows the overlapping of components between the groups.



**Figure 6.** Venn diagrams of the number of significant metabolites ( $p < 0.05$ ) after 2-hour mycotoxin exposure (100 nmol/L per mycotoxin) without pumpkin extract (A) and with pumpkin extract (500 nmol/L) (B).

The total number of metabolites after removing feature repetitions in both the aqueous and organic phases and in positive and negative ionisation modes was 46. Of these, 14 were found in samples with and without pumpkin extract (Table 1). In samples treated with pumpkin extract, only 9-docosene and dihydromorelloflavone were identified regardless of the mycotoxin used, but only dihydromorelloflavone was significantly less abundant in these samples than in positive control (control treated with pumpkin extract), while it was not found in samples not exposed to the extract.

**Table 12.** Log2FC values of metabolites with significantly changed quantity ( $p < 0.05$ ) compared to respective controls (control containing vehicle or vehicle + pumpkin extract (P)) found in the basal media after 2-hour exposure to mycotoxins (100 nmol/L each) with or without pumpkin (500 nmol/L beta-carotene equivalent).

COMPOUND	BEA	BEA + P	OTA	OTA+E	ZEA	ZEA+P	OTA + ZEA + P	OTA + ZEA	BEA+OTA + ZEA	BEA+OTA + ZEA + P
(2R,3S,7S,10S)-2,3,7,10-Tetramethyldodecahydro-cyclopenta[b]quinolizin-2-ol	15.57									
(5E)-(3S)-1.alpha.,25-dihydroxy-3-deoxy-3-thia-vitamin D3 3-oxide / (5E)-(3S)-1.alpha.,25-dihydroxy-3-deoxy-3-thiacholecalciferol 3-oxide				15.68						
12-epi Leukotriene B4-d4	18.12									
12,13-DIHOME-d4	18.35						18.49		18.34	
14,15-LITE4		15.56			15.56				15.56	
2-(3-Phenylpropyl)pyridine			20.60		19.28			17.84		
2-Butyl-5-methyl-4-propyloxazole	15.70			15.49		15.79		15.98	15.88	
2-Ethyl-5-methylpyridine			19.36							
2-Propenal, 3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-	-19.15	18.18	-19.15	16.59		17.06		1.96	-19.15	1.87
2-Protocatechoylphloroglucinolcarboxylate		-16.29						-16.29		-16.29
2,6-Dihydroxy-4-methoxytoluene										2.06



PG(16:0/0:0)	-17.39	-17.11	-17.39	-17.11	-17.39	-17.11	-17.39	-17.11
Pregna-4,16-diene-3,11,20-trione				17.12				
Propyl levulinate			17.22					
Prostaglandin D2-1-glyceryl ester					17.60		18.09	
Prostaglandin D2-1-glyceryl ester								
Rhamnetin 3-rhamnoside			16.60			17.31		16.07
Spiromesifen						16.45		
Streptonigrin						16.70		16.51
Tioconazole								19.47
Vestitone 7-glucoside							17.07	17.05
Xestoaminol C	-16.08	-16.70	-16.08					-16.70

Our findings of antifungal and insecticide compounds including dimethylmaleic acid anhydride, dodemorph, hexazinone, n-cyclopropylamine, and nigrifactin (in samples not treated with pumpkin extract) and spiromesifen, streptonigrin, tioconazole, chloralose, and octadeca-1(14),15,17-trien-13-one in samples treated with the extract point to a prospect of a new line of research and industrial application.

### 4.3.2. Reactome findings

Some of the above 46 metabolites are relevant for human metabolic pathways. One of them is leukotriene 14,15-LTE4, whose abundance was higher than control in ZEA and BEA+OTA+ZEA samples not treated with the pumpkin extract. It was also identified in BEA samples treated with the extract.

Another metabolite is prostaglandin D2-glycerol, found in supernatant samples treated with OTA+ZEA and BEA+OTA+ZEA combinations but not with the pumpkin extract.

Among the fatty acids relevant for human metabolism, we found oleic acid in BEA and pumpkin extract samples and oleamide in BEA+OTA+ZEA samples (Table 1). Phospho-glycerol (PG) (16:0/0:0) was only identified in control and ZEA samples. Higher xestoaminol C was found in ZEA samples (compared to control). 12,13-DiHOME-d4 was more abundant in BEA, OTA+ZEA, and BEA+OTA+ZEA samples. 9-docosene was more abundant than in control in all samples save for those treated with BEA and OTA (BEA alone, OTA alone, and BEA+OTA+ZEA combination).

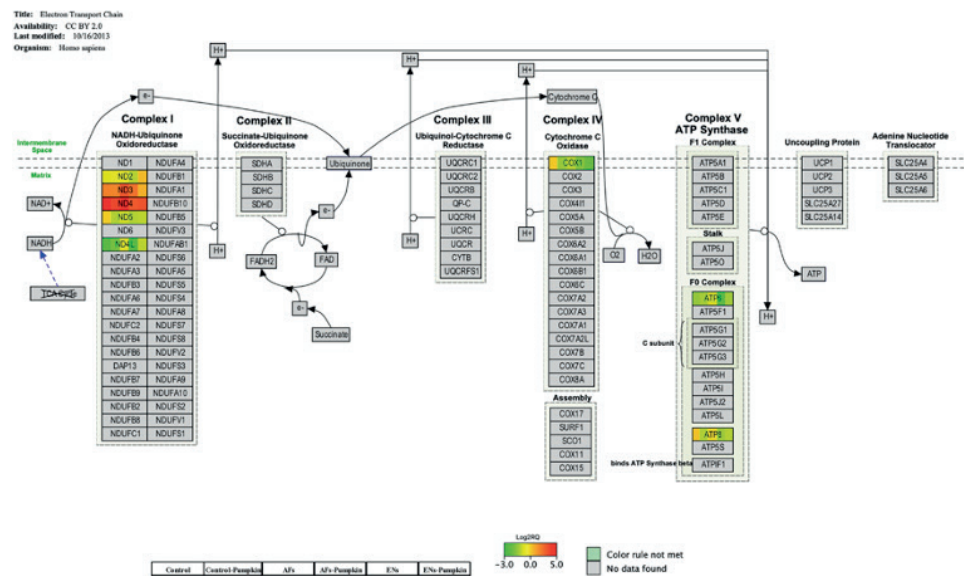
Mercaptoethanol was found in ZEA and OTA+ZEA samples without the pumpkin extract and in OTA+ZEA samples with pumpkin extract (Table 8).

## 4.4. *In vitro* blood brain barrier exposure to mycotoxins and carotenoids pumpkin extract: transcriptional approach

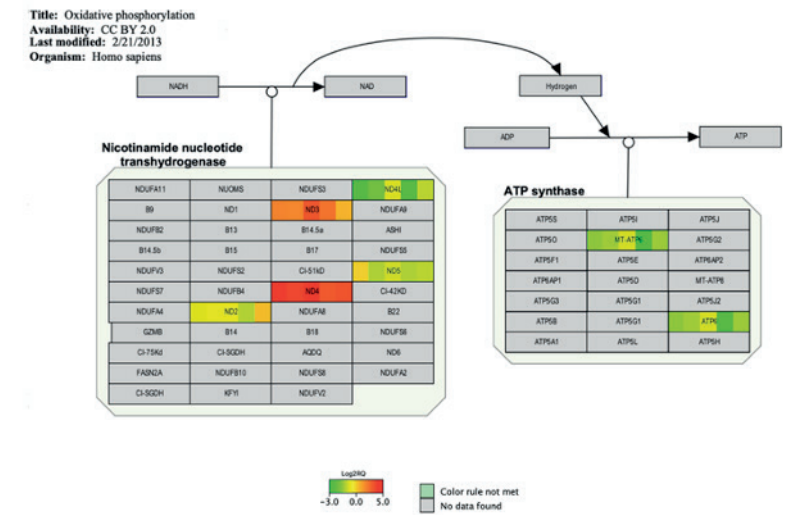
### 4.4.1. Effect of aflatoxins, enniatins and carotenoids on gene expression

DEG analysis of several genes belonging to the different complexes of the electron transport chain (ETC) was performed throughout RT-qPCR reporting statistically significant results for most of the compared treatments in the genes studied (Fig. 7).

a)



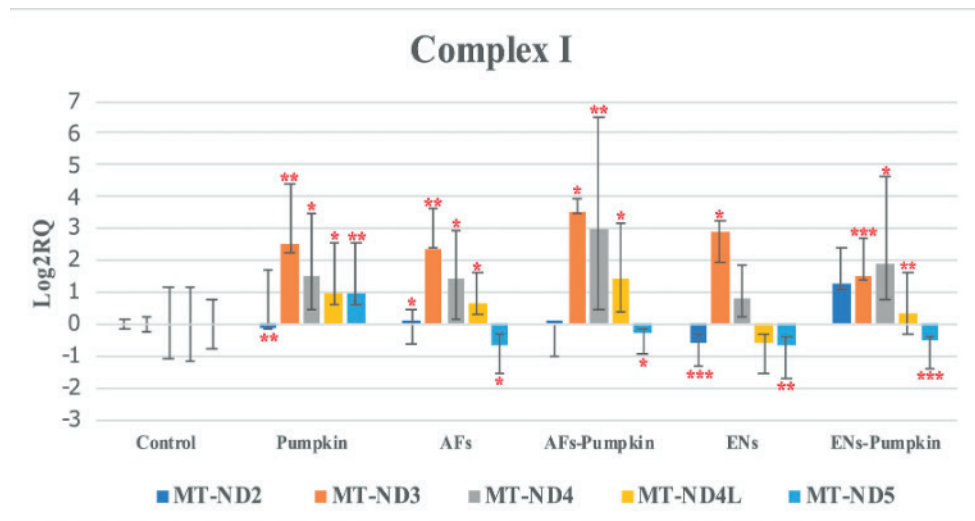
b)



**Figure 7.** a) Genes involved in the ETC pathway for Homo sapiens are shown: in green the down-regulated genes and in red the up-regulated for all conditions tested. b) Genes involved in the oxidative phosphorylation pathway for Homo sapiens are shown

#### 4.4.1.1. Complex I

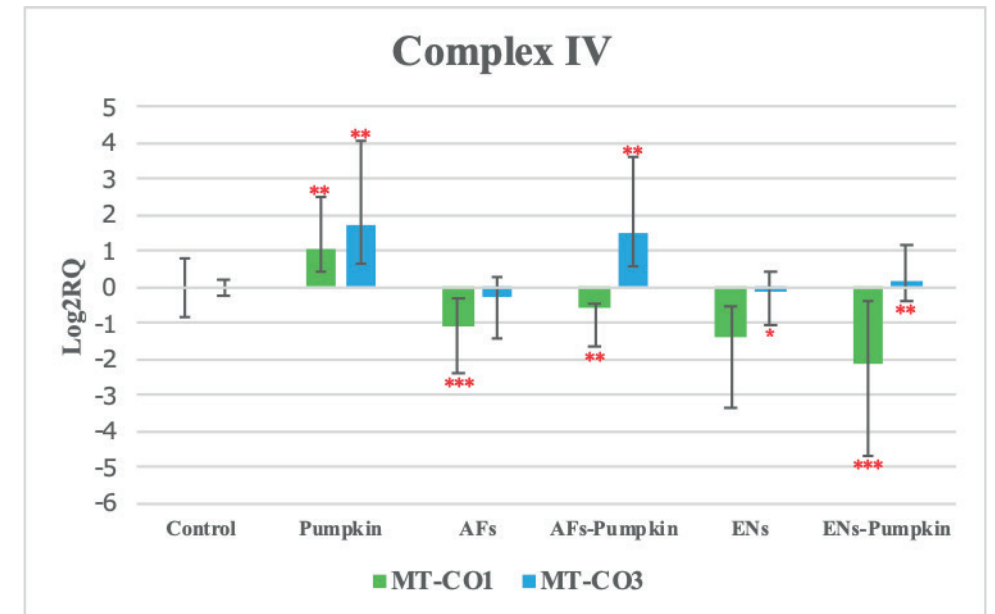
In this study, MT-ND2 was down-regulated for every condition, but for AFs-pumpkin, which reported a similar expression as the control. ENs followed the same trend with more accused differences, finding that ENs-pumpkin significantly reverted ENs down-regulation ( $p \leq 0.05$ , data not shown). MT-ND3 and MT-ND4 were up-regulated for every condition, but ENs for MT-ND4. MT-ND4L was slightly up-regulated for every condition, but ENs. MT-ND5 was slightly down-regulated for every condition, except for pumpkin (Fig. 8).



**Figure 8.** Bar plot showing CI genes relative expression when compared to control (log2RQ = 0) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars, log2RQmin and log2RQmax. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

#### 4.4.1.2. Complex IV

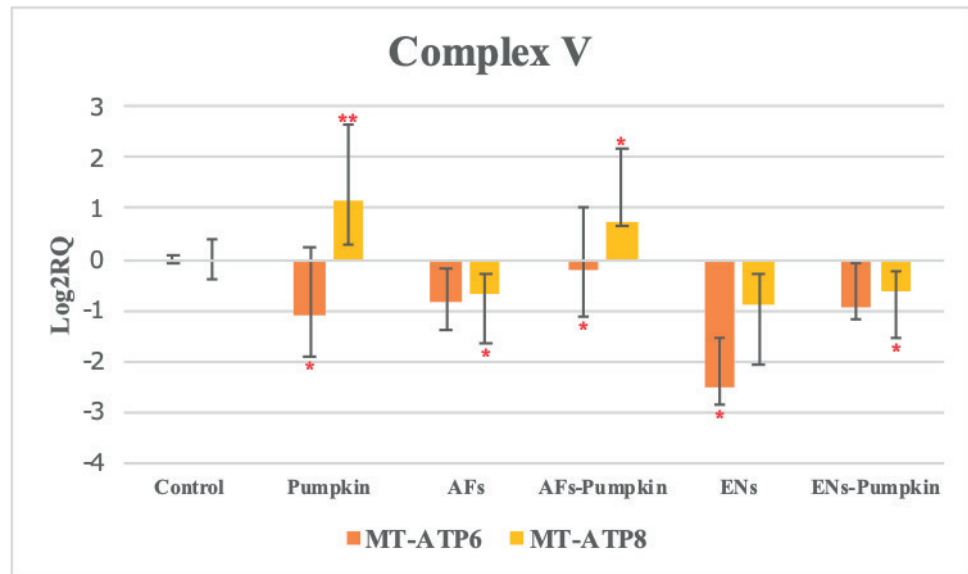
Cytochrome c oxidase (CIV) is a proton-pump form by heme-cooper oxidases representing the final step of the energy transfer enzymes of the ETC both in mammals and prokaryotes. MT-CO1 was slightly down-regulated for all treatments, but pumpkin and ENs, when compared to the Control. Interestingly, both AFs and ENs, mixed with pumpkin, reported significant results compared to AFs and ENs individually (Fig. 9).



**Figure 9.** Bar plot showing CIV genes relative expression when compared to control (log2RQ = 0) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars, log2RQmin and log2RQmax. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

#### 4.4.1.3. Complex V

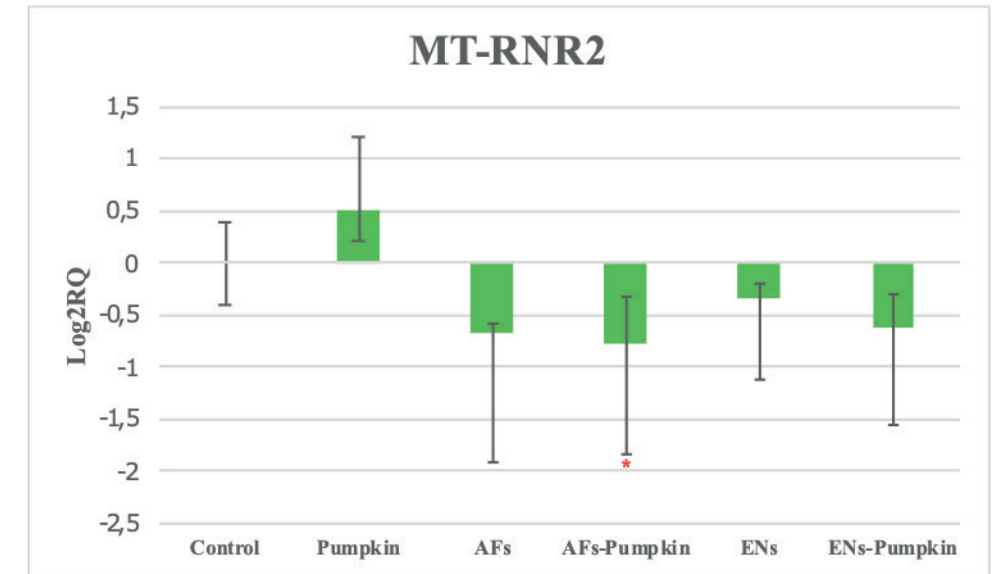
Mitochondrially encoded ATP synthase membrane subunit 6 (MT-ATP6) and Mitochondrially encoded ATP synthase membrane subunit 8 (MT-ATP8) are involved in the synthesis of F<sub>0</sub>, a main subunit of CV. DEG analysis for MT-ATP6 showed down-regulation for pumpkin, AFs-pumpkin and ENs and no significant alteration for AFs and ENs-pumpkin. MT-ATP8 behave differently, being significantly altered for every condition, except ENs (Fig. 10).



**Figure 10.** Bar plot showing CV genes relative expression when compared to control ( $\log_2RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_2RQ_{min}$  and  $\log_2RQ_{max}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.4.1.4. Mitochondrially encoded 16S rRNA

Mitochondrially Encoded 16S rRNA (MT-RNR2) is a non-coding mitochondrial DNA related to apoptosis and biogenesis of ribosomes in eukaryotes. DEG analysis of MT-RNR2 showed no alteration for any of the treatments, but AFs-pumpkin, suggesting it is not a target for any of the mycotoxins or carotenoids tested, at least at these concentrations (Fig. 11).

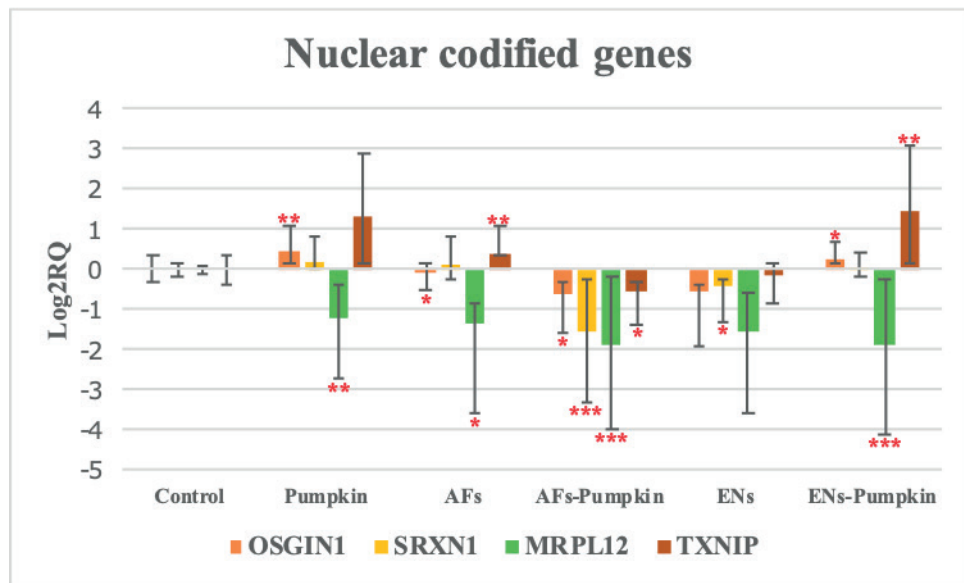


**Figure 11.** Bar plot showing MT-RNR2 genes relative expression when compared to control ( $\log_2RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_2RQ_{min}$  and  $\log_2RQ_{max}$ . \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.4.1.5. Nuclear encoded mitochondrial genes

In eukaryotes, mitochondria function and structure are also mediated by genes belonging to the nuclear DNA. For the current project, 4 important genes were selected: 3 coding antioxidant proteins and 1 coding for ribosome formation.

OSGIN1 was altered for every treatment, but ENs. Sulfiredoxin-1 (SRXN1) only was significantly down-regulated for AFs-pumpkin and ENs treatments. Mitochondrial Ribosomal Protein L12 (MRLP12) was repressed for every treatment, but ENs. Thioredoxin Interacting Protein (TXNIP) was significantly up-regulated for pumpkin and ENs-pumpkin and down-regulated for AFs-pumpkin (Fig. 12).



**Figure 12.** Bar plot showing nuclear codified genes relative expression when compared to control ( $\log_2RQ = 0$ ) after 2 h-exposure to the different treatments by RT-qPCR. RQ, relative quantification. Error bars,  $\log_2RQ_{min}$  and  $\log_2RQ_{max}$ .

\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 4.4.1.6. Pathvisio analysis

Due to the specificity of the assay, 2 data points meeting criterion ( $r$ ) were overlapped for all treatments and two pathways were statistically significant for the 5 studied treatments were the oxidative phosphorylation and the ETC, with 28.6 % and 25 % affected genes, were the most altered pathways. Individual analysis of every treatment also reported two altered pathways common to every condition: Effects of Nitric Oxide pathway and quercetin and Nf-kB/AP-1 Induced Cell Apoptosis (Table 13).

**Table 13.** Pathways overlapped in all conditions by PathVisio ( $p < 0.05$ ).

PATHWAY	POSITIVE ( $r$ )	MEASURED ( $n$ )	TOTAL	%	Z-SCORE	P-VALUE
Electron Transport Chain	8	8	118	100	2	0.014
Oxidative phosphorylation	7	7	68	100	1.53	0.003
Effects of Nitric Oxide	1	1	16	100	0.33	0.004
Quercetin and Nf-kB/AP-1 Induced Cell Apoptosis	1	1	27	100	0.33	0.003

#### 4.4.2. Effects of beauvericine, enniatins, ochratoxin A and zearalenone on gene expression

Transcriptional analysis reported gene expression alterations for most of the genes and conditions studied. The most toxic mixture was BEA-ENs, downregulating most of the genes studied. An upregulation was found for most of the conditions when pumpkin extract was added to the treatment, especially regarding CIV. From gene expression perspective, MT-RNR2 was the most downregulated gene, while TXNIP was the most upregulated gene for every exposure, except for BEA and BEA-ENs. SRXN1 was significantly downregulated for pumpkin and all mycotoxin exposures. Pumpkin inclusion to all mycotoxin exposures but the triple mix upregulated UCP2. MRPL12 did not show significant expression changes in any condition tested (Table 14).



**Table 14.** RT-qPCR Log2FC values of gene expression relative quantification comparing to the control. Bold numbers  $p < 0.05$ ; C, control. P, pumpkin. BEA, beauvericin. EN, enniatins. OTA, ochratoxin A. ZEA, zearalenone.

ETC	GENES	C-P	BEA	BEA-P	ZEA	ZEA-P	OTA	OTA-P	OTA-ZEA	OTA-ZEA-P	BEA-EN	BEA-EN-P	BEA-OTA-ZEA	BEA-OTA-ZEA-P
Complex I	MT-ND2	2.23	1.67	3.48	0.13	1.87	3.17	2.30	2.80	2.29	0.90	6.80	1.20	2.08
	MT-ND3	0.29	0.48	3.13	-0.67	1.37	0.11	2.05	1.88	1.34	-1.03	4.44	0.93	0.46
	MT-ND4	0.79	-0.03	2.77	-1.84	0.71	-1.36	0.87	-0.38	-0.36	-2.74	1.90	-1.22	-1.56
	MT-ND4L	2.34	0.16	3.09	-0.15	2.20	-0.07	2.46	1.92	1.43	-0.67	4.77	0.96	-0.55
	MT-ND5	2.75	0.29	3.87	0.39	2.21	0.95	2.83	2.40	1.42	-0.42	6.45	1.15	0.47
	MT-ND6	1.26	-1.40	3.68	-0.58	1.20	-0.76	2.05	1.25	0.90	-2.18	4.67	-0.47	-1.06
Complex IV	MT-C01	-3.00	-5.55	-2.36	-4.49	-3.09	-4.86	-1.71	-3.63	-5.13	-5.84	-6.38	-5.66	-6.69
	MT-C03	1.43	-2.87	-2.40	-3.69	-2.45	-2.24	-0.63	-3.12	-1.94	-6.03	-5.55	-3.00	-4.70
Complex V	MT-ATP6	-0.54	-2.55	-0.46	-1.76	0.16	0.65	1.39	0.10	0.44	-2.85	-2.07	0.59	-1.11
	MT-ATP8	-0.22	-2.97	-0.87	-1.71	-0.34	0.27	0.66	-0.23	-0.13	-3.38	-2.79	-0.50	-2.32

Nuclear genes	UCP2	2.54	-2.12	3.32	-1.61	4.75	3.39	3.33	0.06	5.76	-3.05	2.58	3.17	-1.18
	MT-RNR2	-2.69	1.77	0.05	-3.37	-4.48	-6.30	-4.26	-4.72	-4.74	-6.08	-6.83	-5.47	-4.64
	MRPL12	0.64	-1.36	3.09	-0.19	0.47	-0.26	-0.56	0.25	1.03	-2.09	-0.86	-0.65	0.09
	SRXN1	-3.70	-0.55	-1.10	-0.47	-2.42	-2.28	-1.84	-0.25	-0.44	-2.37	-1.48	-2.17	0.29
	TXNIP	4.21	-8.31	2.21	-0.06	2.79	5.56	5.09	3.76	4.75	-2.68	5.73	4.27	-0.31
	OSGIN1	0.84	1.19	3.64	0.74	-0.05	-0.34	1.03	2.16	0.06	-1.93	-0.23	-1.01	-0.46
6-Hydroxykaempferol 7-rutinoside		-16.32		17.04				17.18		-16.32				
6'-Hydroxy-2,3,4,5,2',3',4'-heptamethoxychalcone	17.06													
9-Docosene		16.35		16.94	16.63	16.65	16.58	16.33		16.38				
Asp-Met-OH			16.18						16.80					

(7R)-7,15,17-trihydroxy-11-methyl-12-oxabicyclo[12.4.0]octadecan-1(14),15,17-trien-13-one	-17.71	-17.71	-17.71	-17.71	-17.71	-17.71	-17.71	-17.71	-1.68
Dihydromorelloflavone	-16.68	-16.18	-16.18	-16.18	-16.18	-16.18	-16.18	-16.18	-16.18
Dimethylmaleic acid anhydride	17.61	18.04	16.06	17.80	17.12	2.05	17.75	1.92	1.92
Dodemorph	-16.98	18.23	-16.98	-16.82	-16.98	16.30	16.30	16.16	16.16
Herbacetin 8-(2'',3'',4'',triacetyloxylo-			15.76						
Hexazinone		-18.83	-16.76		-16.76			-18.83	-18.83
Ketophenylbutazone						17.33		17.17	17.17
Mercaptoethanol					16.46	19.32	-19.14		
Methylmethionine sulfonium							0.73		
N-(2'-(4-benzenesulfonamide)-ethyl) arachidonoyl amine	21.56	21.28	19.63	16.46	17.65		21.39		

N-(2'-(4-benzenesulfonamide)-ethyl) arachidonoyl amine				17.29	17.69	18.54			
Nigrifactin						18.22	18.52		
Oleamide							16.96		
Oleic acid(d2)		15.34							
Peroxyoctanoic acid				1.53					
PG(16:0/0:0)	-17.39	-17.11	-17.39	-17.11	-17.11	-17.39	-17.11	-17.39	-17.11
Pregna-4,16-diene-3,11,20-trione						17.12			
Propyl levulinate			17.22						
Prostaglandin D2-1-glyceryl ester					17.60		18.09		
Prostaglandin D2-1-glyceryl ester									
Rhamnetin 3-rhamnoside		16.60				17.31		16.07	
Spiromesifen			16.13			16.45			

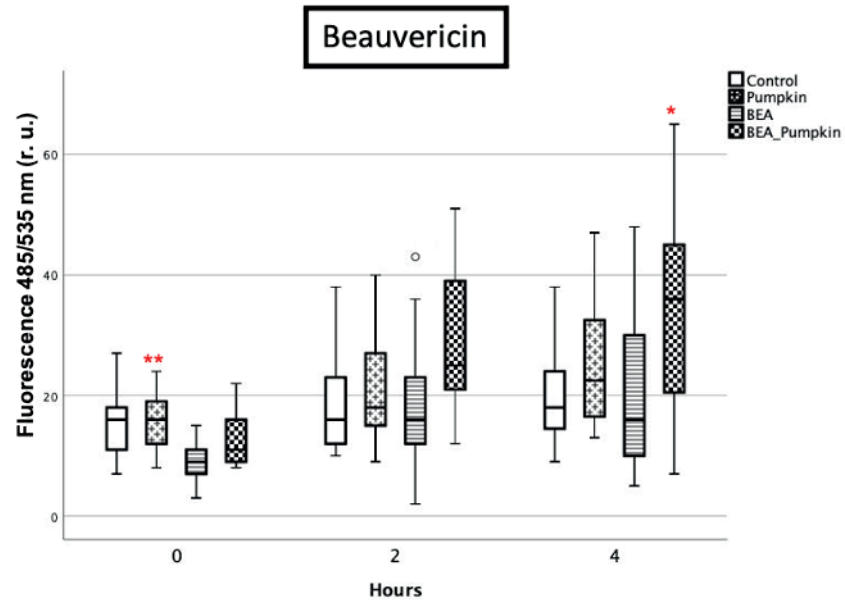
Streptonigrin	16.70	16.51	
Troconazole	19.47		
Vestitone 7-glucoside	17.07	17.05	
Xestoaminol C	-16.08	-16.70	-16.70

#### 4.4.3. Effects of beauvericine, enniatins, ochratoxin A and zearalenone on intracellular ROS generation

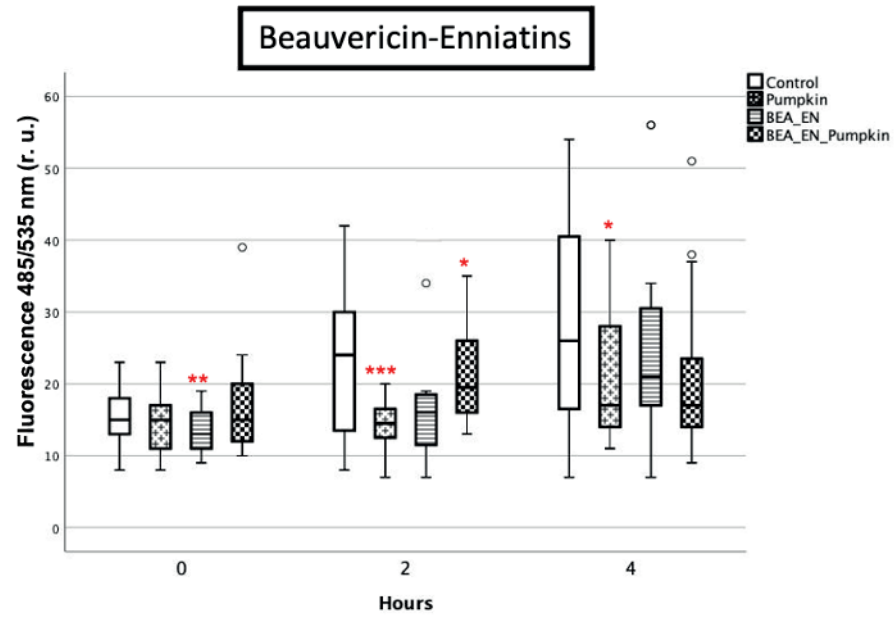
Results showed high intra-variability between replicates and ROS generation varied between conditions. BEA significantly reduced ROS (50%) compared to the control at time 0 h, while no significant differences were found at 2 h (Fig. 12a). The mixture BEA-ENs also reduced ROS significantly at time 0 h (28%), but not at 2 h where pumpkin extract reduced ROS production (49%) and the mixture BEA-ENs-Pumpkin increased it (11%) (Fig. 12b). OTA and OTA-Pumpkin also reduced ROS at the first exposure time (23% both), although no differences were found at 2 h (Fig. 12c). ZEA-Pumpkin treatment showed significant ROS increase at 0 (6%) and 2 h (74%) compared to the control (Fig. 12d). OTA-ZEA-Pumpkin mixture clearly increased ROS generation at 2 h (38%) (Fig. 12e). Finally, the three mycotoxins mixture, BEA-OTA-ZEA only increased ROS when mixed with pumpkin at 0 and 2 h, 19% and 21% respectively.

Results showed high intra-variability between replicates and ROS generation varied between conditions. BEA significantly reduced ROS (50 %) compared to the control at time 0 h, while no significant differences were found at 2 h (Fig. 13a). The mixture BEA-ENs also reduced ROS significantly at time 0 h (28 %), but not at 2 h where pumpkin extract reduced ROS production (49 %) and the mixture BEA-ENs-Pumpkin increased it (11 %) (Fig. 13b). OTA and OTA-Pumpkin also reduced ROS at the first exposure time (23 % both), although no differences were found at 2 h (Fig. 13c). ZEA-Pumpkin treatment showed significant ROS increase at 0 (6 %) and 2 h (74 %) compared to the control (Fig. 13d). OTA-ZEA-Pumpkin mixture clearly increased ROS generation at 2 h (38 %) (Fig. 13e). Finally, the three mycotoxins mixture, BEA-OTA-ZEA only increased ROS when mixed with pumpkin at 0 and 2 h, 19 % and 21 % respectively.

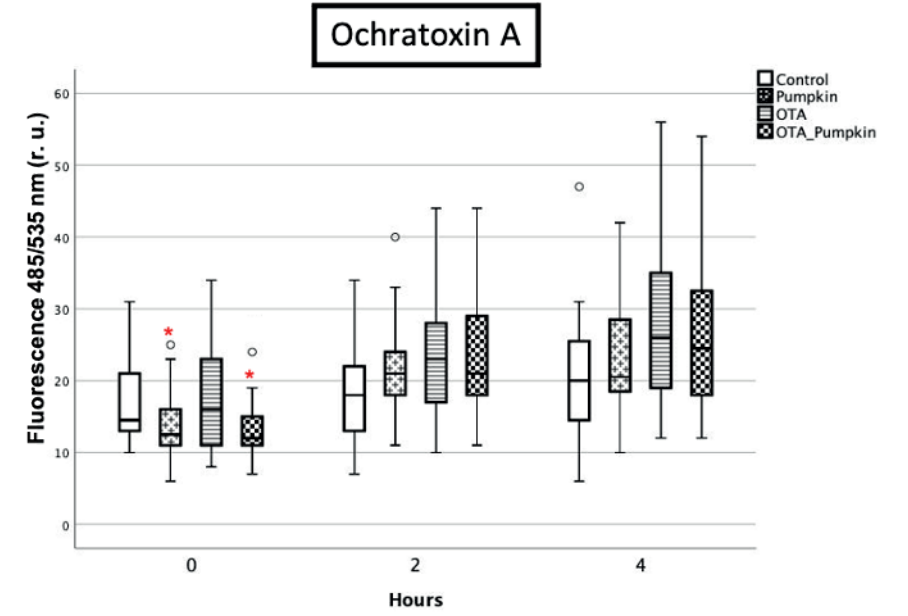
a)



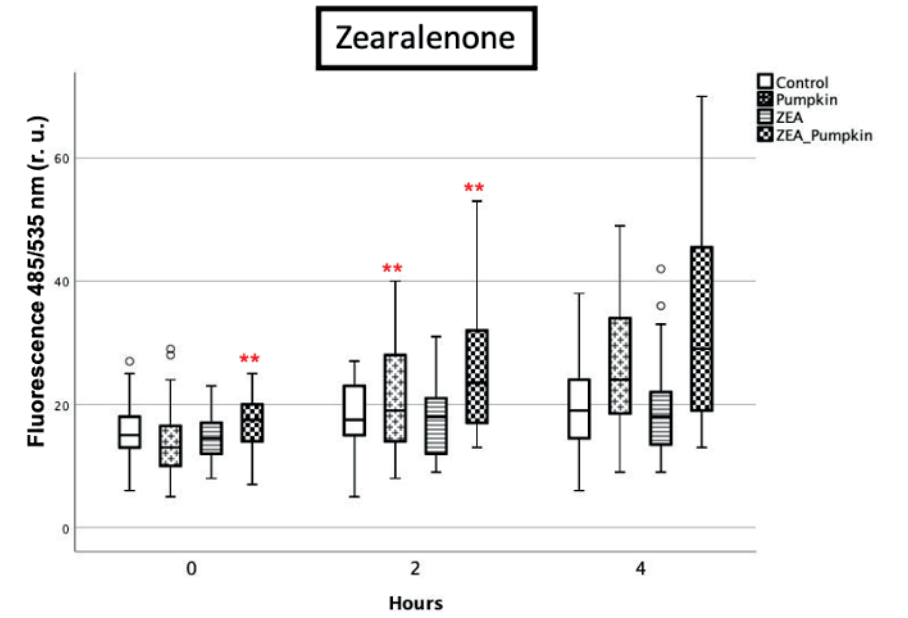
b)



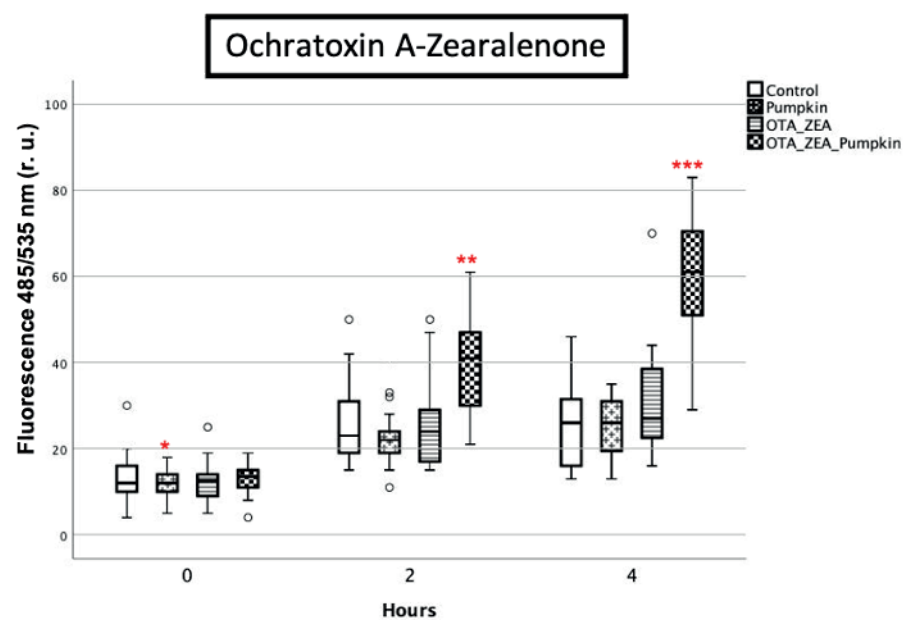
c)



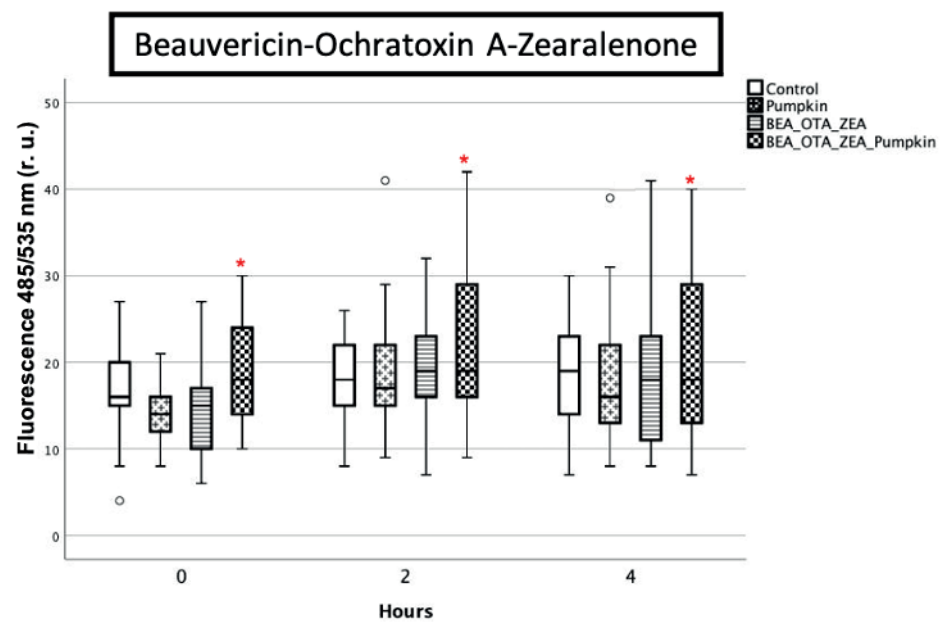
d)



e)



f)



**Figure 13.** H<sub>2</sub>-dichlorofluorescein diacetate probe analysis for Reactive Oxygen Species. R.U, relative units; P, pumpkin extract; Bea, Beauvericin; ENs, ennatiins; OTA, ochratoxin A; Zearalenone, ZEA. Error bars, SD. o, outliers. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001.

DISCUSIÓN  
DISCUSSION

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis bioinformático sobre datos de secuenciación de ARN de células Jurkat expuestas a BEA y ENB.

Por primera vez, se han aplicado dos protocolos para la detección de variantes de un solo nucleótido (SNVs) sobre los datos de secuenciación de células expuestas a micotoxinas: a) SNV-protocolo 1 basado en el flujo de línea complementaria; b) SNV-protocolo 2 basado en el conjunto de herramientas para el análisis genómico (GATK). La optimización de los protocolos bioinformáticos es fundamental para maximizar la potencia y la precisión en la identificación de variantes genéticas. El potencial de estas herramientas para descubrir SNVs susceptibles de ser marcadores genéticos de la exposición a micotoxinas es una nueva vía de investigación en el campo de la toxicología alimentaria (Lam et al., 2020). Los resultados obtenidos dependen en gran medida de la sensibilidad del protocolo, los contextos genómicos, las regiones funcionales y las frecuencias alélicas de las variantes (Liu et al., 2019). En este trabajo se demuestra que existía una amplia variabilidad entre los resultados cuando se aplicaron los dos protocolos de SNVs a los mismos datos de secuenciación de ARN. Por tanto, existe un amplio margen de mejora para la homogeneización de estas aplicaciones.

Al utilizar la tecnología de secuenciación de ARN para detectar variantes genéticas, se espera que las variantes se detecten a partir de lecturas de ARNm, pero éstas no necesariamente se expresan de forma diferencial en un tejido específico (Lam et al., 2020). Es decir, es más frecuente encontrar SNVs en secuencias de ARNm altamente expresados, ya que a mayor volumen de lecturas se incrementa la posibilidad de éxito en la aplicación del protocolo. En el presente estudio, el reconocimiento de SNVs aplicando los dos protocolos difirió del análisis manual. De hecho, el análisis manual de un número reducido de genes mostró SNVs que no fueron descubiertos cuando se utilizaron los dos protocolos automatizados (SNV-protocolo 1 y SNV-protocolo 2). Esto podría deberse a que las exposiciones a BEA y ENB fueron a bajas dosis, provocando que solo un número pequeño de las células expuestas sufriera cambios a nivel genético. Al ser un número menor al 20 %, los protocolos no detectarían estos cambios.

El SNV-protocolo 1, no mostró ningún resultado coincidente con las tres concentraciones utilizadas para cada micotoxina. Sin embargo, el SNV-protocolo 2, detectó la variante de un solo nucleótido rs201003509 perteneciente al gen CUL4A localizado en el cromosoma 13 en las células Jurkat expuestas a BEA y el rs36045790 perteneciente al gen EMILIN1 localizado en el cromoso-

ma 2 para la exposición a ENB en todas las dosis en comparación con los controles (línea roja, Fig. 3). Ambas SNVs eran variantes de sentido erróneo que cambiaban la guanina (G) por una adenina (A) o tiamina (T), sin importancia clínica reportada (Sherry et al., 1999). Posteriormente, se realizó un análisis de RT-PCR para detectar los SNVs rs201003509 y rs36045790, pero los resultados no fueron validados. Estos datos confirman la necesidad de implementar herramientas con mayor sensibilidad que permitan el estudio de las variaciones genéticas a partir de secuencias de ARN, ya que los enfoques actuales no parecen ser adecuados.

Para validar los resultados de expresión génica encontrados en estudios anteriores (Escrivá et al., 2018), se aplicó un protocolo de análisis de la secuencia de ARN diferente que mostró resultados similares entre ellos. La principal diferencia observada con los resultados de expresión génica diferencial (DEGs) anteriores, proviene de la exposición a BEA 1,5  $\mu$ M, donde sólo se encontraron 3 DEGs en comparación con el enfoque anterior que mostró 45. Por el contrario, el número de DEGs de las exposiciones 3 y 5  $\mu$ M para BEA fue muy similar en ambas aproximaciones. El número de DEGs solapados entre ellas, para las dos dosis y micotoxinas, fue de 2196 DEGs para el análisis previo y de 2263 usando el protocolo implementado en este trabajo (Fig. 3). El efecto dependiente de la dosis se confirma en ambos análisis bioinformáticos, ya que el número de genes expresados diferencialmente se incrementa cuando aumenta la exposición a la concentración de BEA.

Los resultados transcriptómicos obtenidos del análisis de la exposición a ENB con el protocolo utilizado en este trabajo, también sugieren un efecto dependiente de la dosis cuando se compara la dosis más baja con las otras dos más altas, pero no entre las muestras expuestas a 3 y 5  $\mu$ M. Esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios anteriores (Alonso-Garrido et al., 2018; Escrivá et al., 2018).

El resultado más relevante del análisis de la expresión génica diferencial indica que la principal diana de la toxicidad de BEA a nivel transcriptómico en células Jurkat es la mitocondria. Se evidenciaron 9 genes mitocondriales expresados diferencialmente solapados para las tres condiciones (1,5, 3 y 5  $\mu$ M) entre los más alterados en comparación con el control (7 de ellos relacionados con el CI y 2 pertenecientes al CV de la CTE) (Tabla 9). La influencia de las ENs sobre la expresión génica de la CTE y los procesos antioxidantes se ha estudiado *in vitro* en células Jurkat y ECV304 diferenciadas e *in vivo* en ratas Wistar por nuestro grupo encontrando resultados similares, aunque la concentración y el tiempo de exposición difieren entre los estudios. En células Jurkat, la exposición combinada de BEA y ENB también se analizó mediante RT-qPCR. Los resulta-

dos de RT-qPCR de la exposición conjunta, mostraron un perfil opuesto de expresión a los de las exposiciones individuales (Escrivá et al., 2019). En el modelo de BHE ECV304, los genes de los CI y CV aparecen mayoritariamente reprimidos tras una exposición corta a baja dosis a ENs mediante el uso de RT-qPCR (Alonso-Garrido et al., 2021).

## 5.2. Análisis proteómico sobre el efecto en la mitocondria de la exposición a BEA y ENB en células Jurkat

Los cambios morfológicos en las mitocondrias son una señal clave que define la programación metabólica durante la quiescencia o la activación celular. Las mitocondrias tienen un papel importante en relación con el destino de las células T. Su fusión es necesaria para los linfocitos T de memoria (TM), mientras que en los linfocitos T efectoros (TE) se encuentran separadas. La fusión en los linfocitos TM organiza la unión de las CTE promoviendo la fosforilación oxidativa y la oxidación de ácidos grasos. Cuando las crestas o pliegues de la membrana interna se configuran en una unión sólida, la CTE funciona eficazmente y mantiene la entrada de piruvato en la mitocondria con un balance redox positivo. La morfología de las crestas como resultado de la fusión mitocondrial, guía la formación de las células TM y las mantiene en un estado quiescente (Buck et al., 2016).

Los cambios funcionales en las mitocondrias inducidos por las micotoxinas pueden perturbar la programación metabólica durante la quiescencia o la activación de los linfocitos, lo que posiblemente tenga un papel relevante en su capacidad para convertirse en células T citotóxicas o auxiliares tras el reconocimiento del antígeno. En este sentido, es destacable que el primer término que aparezca tras el análisis funcional (Tabla 5) sea la acetilación, mostrando que hasta 166 proteínas de un total de 340 estaban relacionadas con ella. Los cambios en la acetilación de proteínas en las mitocondrias normalmente conducen a la pérdida de función en las vías asociadas con la integridad del orgánulo y el metabolismo oxidativo (Baeza et al., 2016).

Asimismo, las proteínas de la membrana mitocondrial implicadas en la translocación de proteínas mitocondriales humanas TOMM (6, 7, 22, 40 y 70) y TIMM (9, 13 y 44), se vieron alteradas tras la exposición a la combinación de micotoxinas. Respectivamente, la translocasa de la membrana externa TOMM7 y de la membrana interna TIMM9 fueron la segunda y la quinta proteína más sobreexpresadas dependientes de la concentración tras la exposición a BEA y ENB. El complejo TIMM8-TIMM13 media la entrada de proteínas como TIMM23, SLC25A12/ARALAR1 y

SLC25A13/ARALAR2, mientras que el complejo predominante TIMM9-TIMM10 de 70 kDa facilita la importación de muchas más proteínas (Roesch et al., 2004). En levaduras, se ha sugerido que el complejo TIM23 explora continuamente el complejo TOM en busca de cadenas polipeptídicas entrantes. Sin embargo, también es posible que la unión de TIM50 a TOM22 y/o la inserción de TIM23 en la membrana externa induzca una conformación del complejo TOM, específicamente propicio para el transporte de proteínas precursoras que contienen pre-secuencias (Waegemann et al., 2015). En el complejo TOM, la subunidad sobreexpresada TOMM7 no funciona para importar proteínas de forma generalizada, sino para derivar y retener la proteína PINK1 y quizás otras en la superficie de las mitocondrias dañadas (Hasson et al., 2013). Estos datos indican un daño importante en las membranas mitocondriales por la exposición a BEA y ENB, reforzando la idea de que su mecanismo de acción es la alteración del poro de transición de permeabilidad mitocondrial a través de la apertura del mismo, lo que inicia una cascada molecular directa obteniendo como resultado la disfunción de la CTE (Mallebrera et al., 2018; Prosperini et al., 2017).

Las mitocondrias también participan en las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Una de las consecuencias de la muerte celular programada establece que el citocromo c se libera a través de un poro formado por la proteína de la membrana mitocondrial externa VDAC. Sin embargo, hace algunos años se propuso que la función principal de VDAC en circunstancias proapoptóticas es controlar el flujo de ATP por cierre en lugar de por apertura, de manera que la liberación de citocromo c del espacio intermembranal mitocondrial se produciría como parte de una ruptura general de la membrana externa mitocondrial (Rostovtseva & Bezrukov, 2008).

En nuestros resultados, las proteínas que forman el canal selectivo de aniones dependiente de voltaje (VDAC1, VDAC2) mostraron la menor abundancia después de la exposición a la mezcla de micotoxinas a 0,01  $\mu$ M y el mayor nivel después de la exposición a 0,5  $\mu$ M, exactamente al contrario que los niveles de citocromo c. En la actualidad, todas las moléculas farmacológicas, péptidos y ARNm descritos dirigidos a VDAC son potencialmente eficaces en el tratamiento terapéutico del cáncer y las neuropatías. Cabe destacar que numerosos compuestos son capaces de inducir la apoptosis en las células cancerosas mediante la modulación de VDAC y ya forman parte de alentadores ensayos clínicos (Magri et al., 2018). La alteración de las proteínas que forman canales de transporte en la membrana mitocondrial corrobora la capacidad ionofórica de BEA y ENB.

Además del citocromo c, los niveles de otras proteínas relacionadas con la CTE se modificaron en comparación con el control. El CV fue el más afectado por la exposición a las micotoxinas (10 proteínas), pero todos los complejos mostraron cambios en sus abundancias. El CI mostró 7

proteínas con niveles alterados, mientras que a nivel transcriptómico se encontraron hasta 27 genes diferencialmente expresados utilizando la exposición individual a BEA o ENB en dosis más altas. Estos datos apuntan a un daño dependiente de la concentración (Alonso-Garrido et al., 2018; Escrivá et al., 2018). El CI es el principal generador de ROS en la mitocondria y a la vez es el responsable de desencadenar el mecanismo de eliminación de las mismas a través de una respuesta antioxidante mediada por la expresión del gen NRF2 inducida por el gen ERK5 (Khan et al., 2018). La deficiencia en la respiración mitocondrial provoca un deterioro de la función lisosomal, promueve la acumulación de proteína p62 y esfingomiélin, e interrumpe las vías endolisomales y la autofagia, vinculando la disfunción mitocondrial primaria con un trastorno de almacenamiento lisosomal (Baixauli et al., 2015). Una disminución significativa de las proteínas del CI podría desembocar en la activación de estos procesos.

El factor traslacional de liberación de péptidos mitocondrial 1 (MTRF1L) es la proteína más abundante en las tres condiciones y una de las cuatro proteínas de la familia en las mitocondrias de mamíferos. Esta proteína reconoce los codones de parada UAA y UAG para facilitar la actividad de liberación de péptidos. Esta sobreexpresión podría influir en la actividad de la CTE, ya que se postula que podría catalizar la liberación de péptidos de las proteínas ND6 y CO1, claves en la respiración celular (Akabane et al., 2014). Esto provocaría una disminución de la actividad del CI y CIV, respectivamente.

Los ribosomas mitocondriales (mitorribosomas) están formados por una pequeña subunidad 28S y una gran subunidad 39S. El gen MRPL12 codifica la proteína 39S que forma homodímeros. Sus niveles de abundancia se mostraron significativamente menores con respecto al control tras la exposición a BEA y ENB. Su interacción con el gen POLRMT forma parte de un mecanismo regulador que coordina la transcripción mitocondrial con la traducción y/o la biogénesis de los ribosomas durante la expresión de los genes mitocondriales y su represión se relaciona con las enfermedades neurodegenerativas (Surmeier et al., 2017; Wang et al., 2007). Además, la proteína ribosómica 60S L5 (RPL5) presentaba el nivel más bajo tras la exposición a micotoxinas y su mutación podría conducir a una disminución del número de ribosomas maduros. Este proceso se relaciona con la leucemia linfoblástica aguda de células T y la anemia de Diamond-Blackfan (Narla & Ebert, 2010). Por tanto, la exposición a BEA y ENB podría afectar a la conformación y función de los mitorribosomas alterando la función mitocondrial.

Tres vías relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (EP, Huntington y EA) fueron estadísticamente significativas en el análisis funcional proteómico. La neurodegeneración está

vinculada a la neuroinflamación a través de un desequilibrio de los linfocitos TE (que liberan, por ejemplo, IFN- $\gamma$  o IL-17) y los linfocitos T reguladores, lo que conduce a daños neuronales y a una reducción del efecto neuroprotector (Sommer et al., 2017). Los hallazgos sobre las proteínas mitocondriales de los linfocitos periféricos, han demostrado que las proteínas mitocondriales podrían formar parte de un potencial panel de biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas. En pacientes con EA, los complejos de la CTE III y IV ven reducida su actividad en plaquetas y linfocitos pero también en tejido cerebral post-mortem (Butterfield et al., 2016). En los resultados obtenidos en el presente estudio, entre las 22 proteínas significativas vinculadas a esta vía, 7 eran del CI, 2 del CII, 2 del CIII, 2 CIV y 7 del CV. Esta información alerta sobre la posible implicación de la exposición a micotoxinas en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas a través de procesos de inflamación y la necesidad de continuar con otros estudios.

El descubrimiento de estas ligeras alteraciones en los genes demuestra que las micotoxinas pueden producir cambios incluso utilizando pequeñas dosis y tiempos de exposición cortos. Sería interesante observar cómo evolucionan estos cambios tras una exposición más larga, ya que las células T humanas viven alrededor de 160 días.

### 5.3. Análisis metabolómico sobre la exposición de micotoxinas y extracto de calabaza a un modelo de barrera hematoencefálica *in vitro*

En el análisis metabolómico de la exposición a micotoxinas, se encontraron varios metabolitos implicados en la respuesta inflamatoria que confirmaron el efecto protector del extracto de calabaza contra el daño inducido por BEA, OTA y ZEA en la BHE.

Utilizando el enfoque de metabolómica no dirigida, la identificación de varios metabolitos en las muestras expuestas a micotoxinas (Tabla 8), apunta a una posible implicación de la vía del ácido araquidónico en la respuesta de la barrera hematoencefálica humana tras una exposición a bajas dosis de micotoxinas. Estos metabolitos de la oxidación del ácido araquidónico activan los mediadores de la cicatrización de heridas y la inflamación (Tallima & El Ridi, 2018; Hanna & Hafez, 2018; Alhouayek et al., 2013; Hoggatt & Pelus, 2010) y aumentan la permeabilidad de la BHE, fundamentalmente el leucotrieno (Easton & Abbott, 2002). La exposición de las células a ZEA, BEA y OTA, (individualmente o combinadas) se ha relacionado anteriormente con la peroxidación lipídica en otros modelos celulares (Juan-García, et al., 2020; Xiao et al., 2019).



En las muestras expuestas a la combinación de micotoxinas y extracto de calabaza, no se identificó ni leucotrieno B4 ni éster de prostaglandina D2-1-gliceril, lo que apunta a la protección del extracto contra el daño inducido por las micotoxinas (Tabla 7). El principal mecanismo de protección del extracto de calabaza está relacionado con su potente eliminación de ROS que disminuye el riesgo de daño oxidativo y en consecuencia de inflamación (Guest & Grant, 2016). Esta acción antiinflamatoria del extracto de calabaza está relacionada con la inhibición de las enzimas implicadas en el metabolismo del ácido araquidónico, como la ciclooxigenasa y la 5-lipoxigenasa (Jucá et al., 2020).

Es interesante remarcar que las muestras tratadas con BEA y extracto de calabaza seguían mostrando leucotrieno 14,15-E4 en el medio basal, pero no el resto de los metabolitos. Podría ocurrir que la interacción entre la actividad ionofórica de BEA que provoca el aumento de la permeabilidad iónica en las membranas biológicas y los niveles de especies reactivas de oxígeno junto con la inestabilidad de los carotenoides (Juan-García et al., 2020; Mallebrera et al., 2017; Subagio & Morita, 2001), sea la razón del aumento de la peroxidación lipídica, ya que este efecto no ha sido observado con otras micotoxinas.

La limitación del estudio estuvo condicionada por la sensibilidad de la técnica que se debió al uso de bajas concentraciones tanto de micotoxinas como de extracto de calabaza para simular escenarios lo más realistas posibles. Se encontraron bajas concentraciones de metabolitos en las muestras basales, lo que significa que algunos metabolitos liberados en los medios en concentraciones aún más pequeñas podrían no haber sido detectados.

En investigaciones futuras, se podrían utilizar compartimentos basales más grandes, que puedan almacenar mayores volúmenes de los medios, e insertos para estos compartimentos con una superficie más amplia. No obstante, nuestro diseño experimental y el análisis estadístico, incluidas las pruebas de corrección múltiples, arrojaron resultados fiables para los metabolitos detectados.

## 5.4. Efecto de la exposición a micotoxinas y extracto de calabaza en la producción de ROS y la expresión génica mitocondrial en células ECV304

La producción de ROS está relacionada con la disfunción mitocondrial, el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la apoptosis. Estos procesos se relacionan con diversos procesos patológicos muy diferentes dependiendo del tejido en el que se produzcan, de su intensidad y de otras alteraciones asociadas. Cuando estos procesos se producen en el sistema nervioso, pueden dar lugar al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Lin & Beal, 2006)

En este sentido y en concordancia con el estudio metabolómico, se realizaron estudios de expresión génica diferencial y generación intracelular de ROS en las células ECV304 para aportar más información sobre el efecto conjunto de micotoxinas y extracto de calabaza en la BHE.

### 5.4.1. Efecto protector del extracto de calabaza frente a la acción de las micotoxinas sobre la CTE

La deficiencia en el CI es la anomalía genética más común en la producción de energía mitocondrial, siendo responsable aproximadamente de un tercio de los trastornos relacionados con la fosforilación oxidativa. Por lo tanto, incluso defectos mínimos en las señales redox del CI pueden generar una alteración que conduzca al estrés oxidativo y en último lugar, a la enfermedad (Lin & Beal, 2006).

Para el gen MT-ND2, la exposición a AFs provoca una ligera represión significativa, mientras que la adición de extracto de calabaza hace que se comporte como el control. Para el resto de los genes, la combinación de AFs y extracto de calabaza aumentó la sobreexpresión frente a la exposición de la micotoxina y el extracto de calabaza aplicados individualmente. La mezcla de ENS y extracto de calabaza revertió la represión significativa de MT-ND2 y MT-ND4L provocada por la exposición individual a ENS (Fig. 8). Los resultados de este trabajo muestran una sobreexpresión generalizada de los genes del CI en las células ECV304 expuestas a AFs, ENS y extracto de calabaza. Esto se traduce en un efecto protector del extracto de calabaza frente a la acción de las micotoxinas, preservando e incluso aumentando la actividad del CI.

La disminución de la actividad de las enzimas del CIV de la mitocondria también se ha relacionado con la EA y la esclerosis lateral amiotrófica (Lezi y Swerdlow, 2012). El análisis de la expresión génica de MT-CO2 y MT-CO3 expuestos a extracto de calabaza mostró una sobreexpresión de estos dos genes, mientras que la exposición a AFs y ENs provocó la represión significativa de MT-CO2 para las dos condiciones y de MT-CO3 solo para AFs. La adición de extracto de calabaza a AFs consiguió mitigar la represión provocada por la micotoxina en MT-CO3, mientras que no tuvo efectos significativos sobre la toxicidad de las ENs. Estos datos están en consonancia con los estudios anteriormente citados que apuntan a un efecto beneficioso de los carotenoides sobre la CTE y en concreto, sobre el CIV (Fig. 9). El extracto de calabaza protegería el CIV evitando la posible liberación del citocromo c que desencadenaría el proceso de apoptosis.

Las enfermedades neurodegenerativas también están relacionadas con la disminución de la síntesis de ATP (Van Bulck et al., 2019). Los cambios de expresión inducidos por el extracto de calabaza, reprimieron ligeramente los niveles de expresión del gen MT-ATP6 y aumentaron el MT-ATP8, mientras que AFs y ENs reprimieron ambos genes respecto al control. Por tanto, el efecto de ambas micotoxinas fue mitigado por el extracto, sugiriendo un efecto protector (Fig. 10). Este resultado es similar a otros reportados en el CTE que han mostrado un efecto protector de estos antioxidantes al aumentar la actividad mitocondrial y por tanto la producción de ATP, pero no la cantidad de ROS (Park et al., 2020).

BEA reguló a la baja el CIV y el CV, lo que apunta a un desequilibrio de la fosforilación oxidativa y a un posible desacoplamiento de la CTE. La mezcla de BEA y extracto de calabaza disminuyó el efecto tóxico de BEA reduciendo la represión de estos genes. El efecto más notable se encontró en la expresión génica del CI al añadir el extracto de calabaza a BEA, ya que todos los genes se vieron sobreexpresados significativamente (2,77-3,87 veces) (Tabla 14).

BEA-ENS fue la mezcla más activa en la expresión génica, reprimiendo significativamente todos los genes de la CTE analizados, menos MT-ND2. El CI se vio ligeramente reprimido por la mezcla. Los complejos más afectados fueron el CIV, siendo la represión de los dos genes cercana a 6 veces, y el CV, que sufrió una represión cercana a 3 veces. Estos datos, al igual que los efectos producidos por BEA, apuntan a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y una disminución de la producción de ATP. La adición de extracto de calabaza mitigó los efectos de la mezcla de micotoxinas para todos los genes estudiados y produjo una clara sobreexpresión del CI. Analizando los datos de la exposición individual a BEA y ENB, el efecto tóxico de la primera parece prevalecer en la mezcla, si bien las dos apuntan a una actividad centrada en los CIV y CV (Tabla 14).

La exposición individual a OTA y ZEA tuvo su efecto más destacado en la expresión del CIV, reprimiendo MT-CO1 y MT-CO3 significativamente. La adición del extracto de calabaza disminuyó la represión del complejo mostrando un efecto protector. En el caso de la mezcla OTA-ZEA, el extracto de calabaza aumentó la represión de MT-CO1 y disminuyó la de MT-CO3 aunque se mantuvo una represión significativa para ambos genes. Esto podría indicar que el mecanismo de acción tóxico de estas micotoxinas estaría fundamentalmente relacionado con el complejo del citocromo c. Es más, su efecto tóxico sobre el CI fue limitado, pero la adición del extracto de calabaza sobreexpresó de manera muy significativa todo el complejo (Tabla 14).

El gen MT-RNR2 fue fuertemente reprimido (2-6,8 veces) en todos los tratamientos con micotoxinas excepto BEA (Tabla 14). Este gen está principalmente relacionado con la regulación negativa de la neuroinflamación, por lo que su represión podría asociarse a un aumento de esta.

#### **5.4.2. Efecto protector del extracto de calabaza frente a la acción de las micotoxinas sobre genes del sistema mitocondrial codificados en el núcleo**

Los genes codificados en el núcleo son clave para la estructura mitocondrial, la funcionalidad y el equilibrio de la fosforilación oxidativa. El tratamiento con AFs mostró una ligera represión para los genes OSGIN1, SRXN1 y TXNIP (Fig. 12). Su regulación a la baja se incrementó en el caso de AFs-calabaza, lo que sugiere un efecto tóxico más agudo que el uso de AFs solo. MRPL12 estaba ligeramente reprimido para todos los tratamientos, siendo más acusado para las mezclas de micotoxinas y la calabaza, lo que podría llevar a una falta de expresión y síntesis de la unidad 39S y por tanto de los mitorribosomas, asociado en última instancia al desarrollo de trastornos neurodegenerativos (Fig. 11) (Surmeier et al., 2017).

TXNIP codifica una proteína encargada de inhibir la función antioxidante de la tioredoxina, lo que provoca la acumulación de ROS y el estrés celular. Esta proteína también funciona como regulador del metabolismo celular y del estrés del retículo endoplásmico. El tratamiento individual con extracto de calabaza aumentó más de 4 veces la expresión de TXNIP, mientras que la unión entre BEA y el extracto de calabaza lo hizo 2 veces. TXNIP fue 8 veces reprimido por el tratamiento con BEA en comparación con el control. Esto indicaría que la exposición a BEA mantendría prácticamente inactivada TXNIP, lo que conduciría a una expresión al alza de la tioredoxina, enzima esencial en la captación de ROS. Por el contrario, a las dosis estudiadas, el extracto de calabaza sobreexpresa TXNIP y mitiga claramente el efecto represor de BEA. Estos resultados indican una

protección del extracto de calabaza frente a la acción tóxica de BEA, que aumentaría en gran medida la actividad del complejo de oxidación reducción a través de la tiorredoxina, enzima normalmente inhibida por TXNIP. Todas las demás condiciones, excepto BEA-ENS y ZEA, informaron de una sobreexpresión de TXNIP (Tabla 14). Además, la represión de TXNIP también fue revertida por BEA-ENS-extracto de calabaza. Estos datos indican un patrón de protección por parte de los carotenoides presentes en el extracto de calabaza, posiblemente reaccionando directamente con las ROS producidas por el mecanismo de toxicidad de las micotoxinas, especialmente BEA, no siendo por tanto necesaria la activación de la tiorredoxina y seguramente por ello produciéndose un aumento de los niveles de expresión de TXNIP.

Otra de las enzimas que participan en el sistema redox es SRXN1 que actúa sobre donadores de grupos sulfuro. En este trabajo, SRXN1 fue significativamente reprimido a la baja en células expuestas a extracto de calabaza y todas las exposiciones a micotoxinas, menos para la combinación de OTA y ZEA. La combinación de extracto de calabaza y micotoxinas disminuyó la represión inducida por OTA, BEA-ENS y BEA-OTA-ZEA, pero la aumentó para las condiciones BEA y ZEA. Este patrón de represión encontrado para la SRXN1 podría estar relacionado con la estructura química de los compuestos estudiados, ya que ninguno de ellos es donador de grupos sulfuro y por tanto no serían un sustrato susceptible para SRXN1.

El aumento de los productos de peroxidación lipídica o de ROS, pueden inducir la expresión del gen UCP2 causando el desacoplamiento de las mitocondrias como mecanismo de protección en respuesta al estrés oxidativo (Zhao et al., 2019). La exposición a BEA y BEA-ENS reguló significativamente el gen UCP2, mientras que ambos tratamientos mezclados con extracto de calabaza sobreexpresaron significativamente este gen en comparación con el control. Esta sobreexpresión podría estar relacionada con el aumento de ROS (Fig. 13a y b) que podría desencadenar el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.



## CONCLUSIONES CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

**1.** El protocolo 1 y el protocolo 2 para la identificación de variantes de un solo nucleótido, no mostraron resultados satisfactorios debido a la falta de sensibilidad que podría estar relacionada con las bajas dosis de micotoxinas ensayadas. Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de optimizar los protocolos para la determinación de variantes de un solo nucleótido con la finalidad de encontrar posibles biomarcadores de exposición a micotoxinas.

El análisis transcriptómico de la secuencia de ARN de células Jurkat expuestas a beauvericina y eniatina B validó los resultados de expresión génica diferencial obtenidos en estudios anteriores.

**2.** En el análisis proteómico de exposición de células Jurkat a bajas concentraciones de beauvericina y eniatina B, se evidencian cambios dependientes de la concentración en los niveles de proteínas mitocondriales que implican principalmente a los complejos de membrana interna y externa, cadena de transporte de electrones y ribosomas.

Tres vías relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Huntington y Alzheimer) fueron estadísticamente significativas en el análisis funcional proteómico.

**3.** El estudio metabolómico de exposición en células ECV304 a beauvericina, ocratoxina A y zearalenona, individualmente y en combinación, mostró la alteración de diversos metabolitos de la vía del ácido araquidónico implicados en la respuesta inflamatoria. Este efecto fue mitigado por la acción del extracto de calabaza.

**4.** La exposición a aflatoxinas, beauvericina, eniatinas, ocratoxina A y zearalenona en células ECV304 diferenciadas reprimió la expresión de la mayoría de los genes mitocondriales analizados. La adición de extracto de calabaza limitó los efectos demostrando su papel protector frente a la acción tóxica de las micotoxinas sobre la cadena de transporte de electrones.

**5.** El extracto de calabaza protegió la expresión génica de los genes estudiados del sistema de oxidación reducción mitocondrial frente a la acción de las micotoxinas.

El extracto de calabaza sobreexpresó el gen UCP2 en todas las exposiciones a micotoxinas, excepto la mezcla de beauvericina, ocratoxina A y zearalenona. Esto podría derivar en el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa.

Estos datos confirman que los procesos mitocondriales en la BHE podrían verse comprometidos por la exposición a micotoxinas y el daño podría ser modulado por antioxidantes procedentes de la dieta como los carotenoides.

**6.** Las técnicas ómicas suponen un cambio de paradigma en el estudio de riesgos toxicológicos de exposición a contaminantes, por lo que es necesario seguir profundizando en los conocimientos que aportan para aumentar la prevención redundando en una mayor seguridad alimentaria.

## REFERENCIAS REFERENCES

Adetunji M.O., Lamont S.J., Abasht B., Schmidt C. J. (2019). Variant analysis pipeline for accurate detection of genomic variants from transcriptome sequencing data. *PLoS ONE*, 14, e0216838.

Agahi, F., Font, G., Juan, C., & Juan-García, A. (2020). Individual and combined effect of zearalenone derivatives and beauvericin mycotoxins on SH-SY5Y cells. *Toxins*, 12(4), 212.

Agahi, F., Juan-García, A., Font, G., & Juan, C. (2021). Study of enzymatic activity in human neuroblastoma cells SH-SY5Y exposed to zearalenone's derivatives and beauvericin. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112227.

Agahi, F., Juan, C., Font, G., & Juan-García, A. (2021). Neurotoxicity of zearalenone's metabolites and beauvericin mycotoxins via apoptosis and cell cycle disruption. *Toxicology*, 456, 152784.

Akabane, S., Ueda, T., Nierhaus, K. H., & Takeuchi, N. (2014). Ribosome rescue and translation termination at non-standard stop codons by ICT1 in mammalian mitochondria. *PLoS genetics*, 10(9), e1004616.

Alhouayek, M., Masquelier, J., Cani, P. D., Lambert, D. M., & Muccioli, G. G. (2013). Implication of the anti-inflammatory bioactive lipid prostaglandin D2-glycerol ester in the control of macrophage activation and inflammation by ABHD6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), 17558-17563.

Alonso-Garrido, M., Frangiamone, M., Font, G., Cimbalo, A., & Manyes, L. (2021). *In vitro* blood brain barrier exposure to mycotoxins and carotenoids pumpkin extract alters mitochondrial gene expression and oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112261.

Alonso-Garrido, M., Escrivá, L., Manyes, L., & Font, G. (2018). Enniatin B induces expression changes in the electron transport chain pathway related genes in lymphoblastic T-cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 437-443.

Alonso-Garrido, M., Tedeschi, P., Maietti, A., Font, G., Marchetti, N., & Manyes, L. (2020). Mitochondrial transcriptional study of the effect of aflatoxins, enniatins and carotenoids *in vitro* in a blood brain barrier model. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111077.

Alsayyah, A., ElMazoudy, R., Al-Namshan, M., Al-Jafary, M., & Alaqeel, N. (2019). Chronic neurodegeneration by aflatoxin B1 depends on alterations of brain enzyme activity and immunoexpression of astrocyte in male rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109407.

Andrews S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. software. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Baeza, J., Smallegan, M. J., & Denu, J. M. (2016). Mechanisms and dynamics of protein acetylation in mitochondria. *Trends in biochemical sciences*, 41(3), 231-244.

Bahey, N. G., Abd Elaziz, H. O., & Gadalla, K. K. E. S. (2015). Toxic effect of aflatoxin B1 and the role of recovery on the rat cerebral cortex and hippocampus. *Tissue and cell*, 47(6), 559-566.

Baixauli, F., Acín-Pérez, R., Villarroya-Beltrí, C., Mazzeo, C., Nuñez-Andrade, N., Gabandé-Rodríguez, E., & Mittelbrunn, M. (2015). Mitochondrial respiration controls lysosomal function during inflammatory T cell responses. *Cell metabolism*, 22(3), 485-498.

Balkir, P., Kemahlioglu, K., & Yucel, U. (2021). Foodomics: A new approach in food quality and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 49-57.

Bensassi, F., Gallerne, C., El Dein, O. S., Lemaire, C., Hajlaoui, M. R., & Bacha, H. (2012). Involvement of mitochondria-mediated apoptosis in deoxynivalenol cytotoxicity. *Food and chemical toxicology*, 50(5), 1680-1689.

Bergantin, C., Maietti, A., Tedeschi, P., Font, G., Manyes, L., & Marchetti, N. (2018). HPLC-UV/Vis-APCI-MS/MS determination of major carotenoids and their bioaccessibility from “Delica” (*Cucurbita maxima*) and “Violina” (*Cucurbita moschata*) pumpkins as food traceability markers. *Molecules*, 23(11), 2791.

Bhat, P. V., Anand, T., Manu, T. M., & Khanum, F. (2018). Restorative effect of L-Dopa treatment against Ochratoxin A induced neurotoxicity. *Neurochemistry International*, 118, 252-263.

Bondy, G. S., Curran, I. H. C., Coady, L. C., Armstrong, C., Bourque, C., Bugiel, S., & Gannon, A. M. (2021). A one-generation reproductive toxicity study of the mycotoxin ochratoxin A in Fischer rats. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112247.

Buck, M. D., O’Sullivan, D., Geltink, R. I. K., Curtis, J. D., Chang, C. H., Sanin, D. E., & Pearce, E. L. (2016). Mitochondrial dynamics controls T cell fate through metabolic programming. *Cell*, 166(1), 63-76.

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments.

Butterfield, D. A., Palmieri, E. M., & Castegna, A. (2016). Clinical implications from proteomic studies in neurodegenerative diseases: lessons from mitochondrial proteins. *Expert review of proteomics*, 13(3), 259-274.

Caloni, F., Fossati, P., Anadón, A., & Bertero, A. (2020). Beauvericin: The beauty and the beast. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 75, 103349.

Cano-Sancho, G., González-Arias, C. A., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Fernández-Cruz, M. L. (2015). Cytotoxicity of the mycotoxins deoxynivalenol and ochratoxin A on Caco-2 cell line in presence of resveratrol. *Toxicology in vitro*, 29(7), 1639-1646.

Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Font, G., & Manyes, L. (2020). Toxicity of mycotoxins in vivo on vertebrate organisms: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 137, 111161.

Cimbalo, A., Alonso-Garrido, M., Font, G., Frangiamone, M., & Manyes, L. (2021). Transcriptional changes after enniatins A, A1, B and B1 ingestion in rat stomach, liver, kidney and lower intestine. *Foods*, 10(7), 1630.

Cimbalo, A., Frangiamone, M., Juan, C., Font, G., Lozano, M., & Manyes, L. (2021). Proteomics evaluation of enniatins acute toxicity in rat liver. *Food and Chemical Toxicology*, 151, 112130.

Coffey, R., Cummins, E., & Ward, S. (2009). Exposure assessment of mycotoxins in dairy milk. *Food control*, 20(3), 239-249.

Core Team. R. 2017. A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

Coskun, E., Jaruga, P., Vartanian, V., Erdem, O., Egner, P. A., Groopman, J. D., & Dizdaroglu, M. (2018). Aflatoxin-guanine DNA adducts and oxidatively induced DNA damage in aflatoxin-treated mice in vivo as measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope dilution. *Chemical research in toxicology*, 32(1), 80-89.

Covarelli, L., Beccari, G., Prodi, A., Generotti, S., Etruschi, F., Meca, G., & Mañes, J. (2015). Biosynthesis of beauvericin and enniatins *in vitro* by wheat *Fusarium* species and natural grain contamination in an area of central Italy. *Food Microbiology*, 46, 618-626.

Crupi, R., Palma, E., Siracusa, R., Fusco, R., Gugliandolo, E., Cordaro, M., & Di Paola, R. (2020). Protective effect of Hydroxytyrosol against oxidative stress induced by the Ochratoxin in kidney cells: *In vitro* and *In Vivo* study. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 136.

Cupp-Sutton, K. A., & Wu, S. (2020). High-throughput quantitative top-down proteomics. *Molecular omics*, 16(2), 91-99.

Da Silva, E. O., Bracarense, A. P., & Oswald, I. P. (2018). Mycotoxins and oxidative stress: where are we?. *World Mycotoxin Journal*, 11(1), 113-134.

Dai, Y., Huang, K., Zhang, B., Zhu, L., & Xu, W. (2017). Aflatoxin B1-induced epigenetic alterations: An overview. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 683-689.

Dellaflora, L., & Dall'Asta, C. (2017). Forthcoming challenges in mycotoxins toxicology research for safer food—a need for multi-omics approach. *Toxins*, 9(1), 18.

Devreese, M., De Baere, S., De Backer, P., & Croubels, S. (2013). Quantitative determination of the *Fusarium* mycotoxins beauvericin, enniatin A, A1, B and B1 in pig plasma using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Talanta*, 106, 212-219.

Doi, K., & Uetsuka, K. (2011). Mechanisms of mycotoxin-induced neurotoxicity through oxidative stress-associated pathways. *International journal of molecular sciences*, 12(8), 5213-5237.

Donnelly, D. P., Rawlins, C. M., DeHart, C. J., Fornelli, L., Schachner, L. F., Lin, Z., & Agar, J. N. (2019). Best practices and benchmarks for intact protein analysis for top-down mass spectrometry. *Nature methods*, 16(7), 587-594.

Easton, A. S., & Abbott, N. J. (2002). Bradykinin increases permeability by calcium and 5-lipoxygenase in the ECV304/C6 cell culture model of the blood–brain barrier. *Brain research*, 953(1-2), 157-169.

Escrivá, L., Alonso-Garrido, M., Font, G., & Manyes, L. (2019). Transcriptional study after Beauvericin and Enniatin B combined exposure in Jurkat T cells. *Food and Chemical Toxicology*, 130, 122-129.

Escrivá, L., Jennen, D., Caiment, F., & Manyes, L. (2018). Transcriptomic study of the toxic mechanism triggered by beauvericin in Jurkat cells. *Toxicology letters*, 284, 213-221.

Eshell, M., Qader, M. M., Jambi, E. J., Hursthouse, A. S., & Rateb, M. E. (2018). Current status and future opportunities of omics tools in mycotoxin research. *Toxins*, 10(11), 433.

Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2020). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited 'FAO estimate' of 25 %. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), 2773-2789.

Fraeyman, S., Croubels, S., Devreese, M., & Antonissen, G. (2017). Emerging *Fusarium* and *Alternaria* mycotoxins: Occurrence, toxicity and toxicokinetics. *Toxins*, 9(7), 228.

Frangiamone, M., Alonso-Garrido, M., Font, G., Cimbalo, A., & Manyes, L. (2022). Pumpkin extract and fermented whey individually and in combination alleviated AFB1-and OTA-induced alterations on neuronal differentiation *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 164, 113011.

Gao, D., Cao, X., Ren, H., Wu, L., Yan, Y., Hua, R. & Liu, J. (2022). Immunotoxicity and uterine transcriptome analysis of the effect of zearalenone (ZEA) in sows during the embryo attachment period. *Toxicology Letters*, 357, 33-42.

Gao, Y., Ye, Q., Bao, X., Huang, X., Wang, J., & Zheng, N. (2020). Transcriptomic and proteomic profiling reveals the intestinal immunotoxicity induced by aflatoxin M1 and ochratoxin A. *Toxicon*, 180, 49-61.

Geng, H., Tan, X., Zhao, M., Ma, Y., & Li, Y. (2022). Proteomic analysis of zearalenone toxicity on mouse thymic epithelial cells. *Journal of Applied Toxicology*, 42(4), 660-670.

Gil, L., Ruiz, P., Font, G., & Manyes, L. (2016). An overview of the applications of hazards analysis and critical control point (HACCP) system to mycotoxins. *Revista de Toxicología*, 33(1), 50-55.

Gong, X., Draper, C. S., Allison, G. S., Marisiddaiah, R., & Rubin, L. P. (2017). Effects of the macular carotenoid lutein in human retinal pigment epithelial cells. *Antioxidants*, 6(4), 100.

González-Alvarez, M. E., McGuire, B. C., & Keating, A. F. (2021). Obesity alters the ovarian proteomic response to zearalenone exposure. *Biology of reproduction*, 105(1), 278-289.

Gromadzka, K., Waskiewicz, A., Chelkowski, J., & Golinski, P. (2008). Zearalenone and its metabolites: occurrence, detection, toxicity and guidelines. *World Mycotoxin Journal*, 1(2), 209-220.

Gruber-Dorninger, C., Novak, B., Nagl, V., & Berthiller, F. (2017). Emerging mycotoxins: Beyond traditionally determined food contaminants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(33), 7052-7070.

Guest, J., & Grant, R. (2016). Carotenoids and neurobiological health. The benefits of natural products for neurodegenerative diseases (pp. 199-228). Springer, Cham.

Guo, Y., Yu, H., Samuels, D. C., Yue, W., Ness, S., & Zhao, Y. Y. (2019). Single-nucleotide variants in human RNA: RNA editing and beyond. *Briefings in Functional Genomics*, 18(1), 30-39.

Guo Y., Zhao S., Sheng Q., Samuels D.C., Shyr Y. (2017). The discrepancy among single nucleotide variants detected by DNA and RNA high throughput sequencing data. *BMC Genomics*, 18, 690.

Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of advanced research*, 11, 23-32.

Hannon, GJ. (2010). [http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/index.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html).

Hasson, S. A., Kane, L. A., Yamano, K., Huang, C. H., Sliter, D. A., Buehler, E., & Youle, R. J. (2013). High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature*, 504(7479), 291-295.

Heussner, A. H., & Bingle, L. E. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253-4282.

Hoffman, R., Sultan, L. D., Saada, A., Hirschberg, J., Osterzetsker-Biran, O., & Gruenbaum, Y. (2019). Astaxanthin extends lifespan via altered biogenesis of the mitochondrial respiratory chain complex III. *Biorxiv*, 698001.

Hoggatt, J., & Pelus, L. M. (2010). Eicosanoid regulation of hematopoiesis and hematopoietic stem and progenitor trafficking. *Leukemia*, 24(12), 1993-2002.

Hu, H., Tan, C. C., Tan, L., & Yu, J. T. (2017). A mitocentric view of Alzheimer's disease. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6046-6060.

Huang, D. W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols*, 4(1), 44-57.

Ikegwonu, F. I. (1983). The neurotoxicity of aflatoxin B1 in the rat. *Toxicology*, 28(3), 247-259.

Islam, M. T., Mishra, S. K., Tripathi, S., de Alencar, M. V. O. B., e Sousa, J. M. D. C., Rolim, H. M. L., & Melo-Cavalcante, A. A. D. C. (2018). Mycotoxin-assisted mitochondrial dysfunction and cytotoxicity: Unexploited tools against proliferative disorders. *IUBMB life*, 70(11), 1084-1092.

Iuga, C., Seicean, A., Iancu, C., Buiga, R., Sappa, P. K., Völker, U., & Hammer, E. (2014). Proteomic identification of potential prognostic biomarkers in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Proteomics*, 14(7-8), 945-955.

Izco, M., Vettorazzi, A., Forcen, R., Blesa, J., de Toro, M., Alvarez-Herrera, N., & Alvarez-Erviti, L. (2021). Oral subchronic exposure to the mycotoxin ochratoxin A induces key pathological features of Parkinson's disease in mice six months after the end of the treatment. *Food and Chemical Toxicology*, 152, 112164.

Ji, J., Wang, Q., Wu, H., Xia, S., Guo, H., Blaženović, I., & Sun, X. (2019). Insights into cellular metabolic pathways of the combined toxicity responses of Caco-2 cells exposed to deoxynivalenol, zearalenone and Aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 126, 106-112.

Ji, J., Zhu, P., Blaženović, I., Cui, F., Gholami, M., Sun, J., & Sun, X. (2018). Explaining combinatorial effects of mycotoxins Deoxynivalenol and Zearalenone in mice with urinary metabolomic profiling. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.

Ji, J., Zhu, P., Cui, F., Pi, F., Zhang, Y., Li, Y., & Sun, X. (2017). The antagonistic effect of mycotoxins deoxynivalenol and zearalenone on metabolic profiling in serum and liver of mice. *Toxins*, 9(1), 28.

Ji, J., Zhu, P., Pi, F., Sun, C., Jiang, H., Sun, J., & Sun, X. (2016). GC-TOF/MS-based metabolomic strategy for combined toxicity effects of deoxynivalenol and zearalenone on murine macrophage ANA-1 cells. *Toxicon*, 120, 175-184.

Juan-García, A., Carbone, S., Ben-Mahmoud, M., Sagratini, G., & Mañes, J. (2020). Beauvericin and ochratoxin A mycotoxins individually and combined in HepG2 cells alter lipid peroxidation, levels of reactive oxygen species and glutathione. *Food and Chemical Toxicology*, 139, 111247.

Juan-García, A., Tolosa, J., Juan, C., & Ruiz, M. J. (2019). Cytotoxicity, genotoxicity and disturbance of cell cycle in HepG2 cells exposed to OTA and BEA: single and combined actions. *Toxins*, 11(6), 341.

Jucá, M. M., Cysne Filho, F. M. S., de Almeida, J. C., Mesquita, D. D. S., Barriga, J. R. D. M., Dias, K. C. F., & Vasconcelos, S. M. M. (2020). Flavonoids: biological activities and therapeutic potential. *Natural product research*, 34(5), 692-705.

Karbowski, M., & Neutzner, A. (2012). Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta neuropathologica*, 123(2), 157-171.

Kaya, E. M. Ö., Korkmaz, O. T., Uğur, D. Y., Şener, E., Tunçel, A. N., & Tunçel, M. (2019). Determination of Ochratoxin-A in the brain microdialysates and plasma of awake, freely moving rats using ultra high performance liquid chromatography fluorescence detection method. *Journal of Chromatography B*, 1125, 121700.

Khan, A.U.H., Allende-Vega, N., Gitenay, D., Garaude, J., Vo, D.N., Belkhala, S., (2018). Mitochondrial Complex I activity signals antioxidant response through ERK5. *Scientific Reports*, 8 (1), 7420.



Kolde R. 2019. Pheatmap: pretty heatmaps. R Package Version 1.0.10.

Komsky-Elbaz, A., Kalo, D., & Roth, Z. (2020). Effect of aflatoxin B1 on bovine spermatozoa's proteome and embryo's transcriptome. *Reproduction (Cambridge, England)*, 160(5), 709-723.

Kouri, K., Lemmens, M., & Lemmens-Gruber, R. (2003). Beauvericin-induced channels in ventricular myocytes and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1609(2), 203-210.

Kovalevich, J., Santerre, M., & Langford, D. (2021). Considerations for the Use of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells in Neurobiology. In *Neuronal Cell Culture* (pp. 9-23). Humana, New York, NY.

Kovalsky, P., Kos, G., Nährer, K., Schwab, C., Jenkins, T., Schatzmayr, G., & Krska, R. (2016). Co-occurrence of regulated, masked and emerging mycotoxins and secondary metabolites in finished feed and maize—An extensive survey. *Toxins*, 8(12), 363.

Krug, I., Behrens, M., Esselen, M., & Humpf, H. U. (2018). Transport of enniatin B and enniatin B1 across the blood-brain barrier and hints for neurotoxic effects in cerebral cells. *PLoS one*, 13(5), e0197406.

Lai, F. N., Liu, X. L., Li, N., Zhang, R. Q., Zhao, Y., Feng, Y. Z., & Li, L. (2018). Phosphatidylcholine could protect the defect of zearalenone exposure on follicular development and oocyte maturation. *Aging (Albany NY)*, 10(11), 3486.

Lam, S., Zeidan, J., Miglior, F., Suárez-Vega, A., Gómez-Redondo, I., Fonseca, P. A. S., & Cánovas, A. (2020). Development and comparison of RNA-sequencing pipelines for more accurate SNP identification: practical example of functional SNP detection associated with feed efficiency in Nellore beef cattle. *BMC genomics*, 21(1), 1-17.

Lecomte, S., Lelong, M., Bourguine, G., Efstathiou, T., Saligaut, C., & Pakdel, F. (2017). Assessment of the potential activity of major dietary compounds as selective estrogen receptor modulators in two distinct cell models for proliferation and differentiation. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 325, 61-70.

Lee, J. Y., Lim, W., Ryu, S., Kim, J., & Song, G. (2019). Ochratoxin A mediates cytotoxicity through the MAPK signaling pathway and alters intracellular homeostasis in bovine mammary epithelial cells. *Environmental Pollution*, 246, 366-373.

Lezi, E., & Swerdlow, R. H. (2012). Mitochondria in neurodegeneration. *Advances in Mitochondrial Medicine*, 269-286.

Li, W., Sang, Y., & Zhang, G. (2017). Combined cytotoxicity of aflatoxin B1 and deoxynivalenol to hepatoma HepG2/C3A cells. *World Mycotoxin Journal*, 10(4), 387-399.

Li, Y., Zhang, B., Huang, K., He, X., Luo, Y., Liang, R., & Xu, W. (2014). Mitochondrial proteomic analysis reveals the molecular mechanisms underlying reproductive toxicity of zearalenone in MLTC-1 cells. *Toxicology*, 324, 55-67.

Lin, M. T., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), 787-795.

Liu, F., Zhang, Y., Zhang, L., Li, Z., Fang, Q., Gao, R., & Zhang, Z. (2019). Systematic comparative analysis of single-nucleotide variant detection methods from single-cell RNA sequencing data. *Genome biology*, 20(1), 1-15.

Liu, G., Yan, T., Wang, J., Huang, Z., Chen, X., Jia, G., & Tang, J. (2013). Biological system responses to zearalenone mycotoxin exposure by integrated metabolomic studies. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 11212-11221.

Liu, X. L., Wu, R. Y., Sun, X. F., Cheng, S. F., Zhang, R. Q., Zhang, T. Y., & Li, L. (2018). Mycotoxin zearalenone exposure impairs genomic stability of swine follicular granulosa cells *in vitro*. *International journal of biological sciences*, 14(3), 294.

Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, 13(5), e1005457.

Lu, X., Hu, B., Shao, L., Tian, Y., Jin, T., Jin, Y., & Fan, X. (2013). Integrated analysis of transcriptomics and metabolomics profiles in aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in rat. *Food and chemical toxicology*, 55, 444-455.

Ma, J., Liu, Y., Guo, Y., Ma, Q., Ji, C., & Zhao, L. (2021). Transcriptional profiling of aflatoxin B1-induced oxidative stress and inflammatory response in macrophages. *Toxins*, 13(6), 401.

Magri, A., Reina, S., & De Pinto, V. (2018). VDAC1 as pharmacological target in cancer and neurodegeneration: focus on its role in apoptosis. *Frontiers in chemistry*, 6, 108.

Mallebrera, B., Brandolini, V., Font, G., & Ruiz, M. J. (2015). Cytoprotective effect of resveratrol diastereomers in CHO-K1 cells exposed to beauvericin. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 319-327.

Mallebrera, B., Juan-Garcia, A., Font, G., & Ruiz, M. J. (2016). Mechanisms of beauvericin toxicity and antioxidant cellular defense. *Toxicology Letters*, 246, 28-34.

Mallebrera, B., Maietti, A., Tedeschi, P., Font, G., Ruiz, M. J., & Brandolini, V. (2017). Antioxidant capacity of trans-resveratrol dietary supplements alone or combined with the mycotoxin beauvericin. *Food and chemical toxicology*, 105, 315-318.

Mallebrera, B., Prosperini, A., Font, G., & Ruiz, M. J. (2018). *In vitro* mechanisms of Beauvericin toxicity: A review. *Food and Chemical Toxicology*, 111, 537-545.

Mally, A., Solfrizzo, M., & Degen, G. H. (2016). Biomonitoring of the mycotoxin Zearalenone: current state-of-the art and application to human exposure assessment. *Archives of toxicology*, 90(6), 1281-1292.

Maranghi, F., Tassinari, R., Narciso, L., Tait, S., Rocca, C. L., Felice, G. D., & Reale, O. (2018). In vivo toxicity and genotoxicity of beauvericin and enniatins. Combined approach to study in vivo toxicity and genotoxicity of mycotoxins beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB). *EFSA Supporting Publications*, 15(5), 1406E.

Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and chemical toxicology*, 60, 218-237.

Mehrzad, J., Hosseinkhani, S., & Malvandi, A. M. (2018). Human microglial cells undergo proapoptotic induction and inflammatory activation upon *in vitro* exposure to a naturally occurring level of aflatoxin B1. *Neuroimmunomodulation*, 25(3), 176-183.

Merrick, B. A., Phadke, D. P., Auerbach, S. S., Mav, D., Stiegelmeier, S. M., Shah, R. R., & Tice, R. R. (2013). RNA-Seq profiling reveals novel hepatic gene expression pattern in aflatoxin B1 treated rats. *PLoS one*, 8(4), e61768.

Mi, H., Muruganujan, A., Huang, X., Ebert, D., Mills, C., Guo, X., & Thomas, P. D. (2019). Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v. 14.0). *Nature protocols*, 14(3), 703-721.

Moll, U. M., & Zaika, A. (2001). Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS letters*, 493(2-3), 65-69.

Monson, M. S., Cardona, C. J., Coulombe, R. A., & Reed, K. M. (2016). Hepatic transcriptome responses of domesticated and wild turkey embryos to aflatoxin B1. *Toxins*, 8(1), 16.

Montesano, D., Juan-García, A., Agahi, F., Manes, J., & Juan, C. (2021). Effects of mycotoxins in Caco-2 cells and HepG2 cells are alleviated by bioactive compounds from goji berries. *Toxicology Letters*, 350, S107.

Muthulakshmi, S., Maharajan, K., Habibi, H. R., Kadirvelu, K., & Venkataramana, M. (2018). Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere*, 198, 111-121.

Nanjaiah, H., & Vallikannan, B. (2019). Lutein upregulates the PGC-1 $\alpha$ , NRF1, and TFAM expression by AMPK activation and downregulates ROS to maintain mtDNA integrity and mitochondrial biogenesis in hyperglycemic ARPE-19 cells and rat retina. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(6), 999-1009.

Narla, A., & Ebert, B. L. (2010). Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 115(16), 3196-3205.

Nguyen, V. T. T., König, S., Eggert, S., Endres, K., & Kins, S. (2022). The role of mycotoxins in neurodegenerative diseases: current state of the art and future perspectives of research. *Biological Chemistry*, 403(1), 3-26.

Nishide, Y., Tousen, Y., Tadaishi, M., Inada, M., Miyaura, C., Kruger, M. C., & Ishimi, Y. (2015). Combined effects of soy isoflavones and  $\beta$ -carotene on osteoblast differentiation. *International journal of environmental research and public health*, 12(11), 13750-13761.

Nourbakhsh, F., & Tajbakhsh, E. (2021). Neurotoxicity mechanism of Ochratoxin A. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 13(2), 34-45.

Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin research*, 33(1), 65-73.

Pan, P., Ying, Y., Ma, F., Zou, C., Yu, Y., Li, Y., & Wang, Y. (2020). Zearalenone disrupts the placental function of rats: A possible mechanism causing intrauterine growth restriction. *Food and Chemical Toxicology*, 145, 111698.

Paradells, S., Rocamonde, B., Llinares, C., Herranz-Pérez, V., Jimenez, M., Garcia-Verdugo, J. M., & Garcia-Esparza, M. A. (2015). Neurotoxic effects of ochratoxin A on the subventricular zone of adult mouse brain. *Journal of Applied Toxicology*, 35(7), 737-751.

Park, H. A., & Ellis, A. C. (2020). Dietary antioxidants and Parkinson's disease. *Antioxidants*, 9(7), 570.

Park, H. A., Hayden, M. M., Bannerman, S., Jansen, J., & Crowe-White, K. M. (2020). Anti-apoptotic effects of carotenoids in neurodegeneration. *Molecules*, 25(15), 3453.

Park, S., Lee, J. Y., You, S., Song, G., & Lim, W. (2020). Neurotoxic effects of aflatoxin B1 on human astrocytes *in vitro* and on glial cell development in zebrafish *in vivo*. *Journal of hazardous materials*, 386, 121639.

Park, S., Lim, W., You, S., & Song, G. (2019). Ochratoxin A exerts neurotoxicity in human astrocytes through mitochondria-dependent apoptosis and intracellular calcium overload. *Toxicology Letters*, 313, 42-49.

Pauletto, M., Tolosi, R., Giantin, M., Guerra, G., Barbarossa, A., Zaghini, A., & Dacasto, M. (2020). Insights into Aflatoxin B1 Toxicity in Cattle: An *in vitro* whole-transcriptomic approach. *Toxins*, 12(7), 429.

Pei, X., Zhang, W., Jiang, H., Liu, D., Liu, X., Li, L., & Li, D. (2021). Food-Origin Mycotoxin-Induced Neurotoxicity: Intend to Break the Rules of Neuroglia Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021.

Pérez-Fuentes, N., Alvariño, R., Alfonso, A., González-Jartín, J., Gegunde, S., Vieytes, M. R., & Botana, L. M. (2021). Single and combined effects of regulated and emerging mycotoxins on viability and mitochondrial function of SH-SY5Y cells. *Food and Chemical Toxicology*, 154, 112308.

Piñeiro, C., Carrera, M., Cañas, B., Lekube, X., & Martínez, I. (2015). Proteomics and food analysis: Principles, techniques, and applications. *Handbook of Food Analysis-Two Volume Set*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 393-416.

Pleadin, J., Frece, J., & Markov, K. (2019). Mycotoxins in food and feed. *Advances in food and nutrition research*, 89, 297-345.

Prosperini, A., Berrada, H., Ruiz, M. J., Caloni, F., Coccini, T., Spicer, L. J., & Lafranconi, A. (2017). A review of the mycotoxin enniatin B. *Frontiers in Public Health*, 5, 304.

Prosperini, A., Juan-García, A., Font, G., & Ruiz, M. J. (2013). Reactive oxygen species involvement in apoptosis and mitochondrial damage in Caco-2 cells induced by enniatins A, A1, B and B1. *Toxicology letters*, 222(1), 36-44.

Pyo, M. C., Choi, I. G., & Lee, K. W. (2021). Transcriptome analysis reveals the AhR, Smad2/3, and HIF-1 $\alpha$  pathways as the mechanism of ochratoxin A toxicity in kidney cells. *Toxins*, 13(3), 190.

Qureshi, H., Hamid, S. S., Ali, S. S., Anwar, J., Siddiqui, A. A., & Khan, N. A. (2015). Cytotoxic effects of aflatoxin B1 on human brain microvascular endothelial cells of the blood-brain barrier. *Medical mycology*, 53(4), 409-416.

Rai, A., Das, M., & Tripathi, A. (2020). Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2710-2729.

Robinson, J. T., Thorvaldsdóttir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., & Mesirov, J. P. (2011). Integrative genomics viewer. *Nature biotechnology*, 29(1), 24-26.

Robinson M. D., McCarthy D. J., & Smyth G. K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 26, 139–140.

Roesch, K., Hynds, P. J., Varga, R., Tranebjaerg, L., & Koehler, C. M. (2004). The calcium-binding aspartate/glutamate carriers, citrin and aralar1, are new substrates for the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Human molecular genetics*, 13(18), 2101-2111.

Ropejko, K., & Twarużek, M. (2021). Zearalenone and its metabolites—general overview, occurrence, and toxicity. *Toxins*, 13(1), 35.

Rostovtseva, T. K., & Bezrukov, S. M. (2008). VDAC regulation: role of cytosolic proteins and mitochondrial lipids. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 40(3), 163-170.

Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., & Sanchez-Ramos, J. (2006). Can low level exposure to ochratoxin-A cause parkinsonism? *Journal of the neurological sciences*, 249(1), 68-75.

Sava, V., Reunova, O., Velasquez, A., Harbison, R., & Sanchez-Ramos, J. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology*, 27(1), 82-92.

Sava, V., Velasquez, A., Song, S., & Sanchez-Ramos, J. (2007). Adult hippocampal neural stem/progenitor cells *in vitro* are vulnerable to the mycotoxin ochratoxin-A. *Toxicological Sciences*, 98(1), 187-197.

Sherry, S. T., Ward, M., & Sirotkin, K. (1999). dbSNP—database for single nucleotide polymorphisms and other classes of minor genetic variation. *Genome research*, 9(8), 677-679.

Søderstrøm, S., Lie, K. K., Lundebye, A. K., & Søfteland, L. (2022). Beauvericin (BEA) and enniatin B (ENNB)-induced impairment of mitochondria and lysosomes—Potential sources of intracellular reactive iron triggering ferroptosis in Atlantic salmon primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology*, 112819.

Soler, L., Stella, A., Seva, J., Pallarés, F. J., Lahjouji, T., Burlet-Schiltz, O., & Oswald, I. P. (2020). Proteome changes induced by a short, non-cytotoxic exposure to the mycoestrogen zearalenone in the pig intestine. *Journal of Proteomics*, 224, 103842.

Sommer, A., Winner, B., & Prots, I. (2017). The Trojan horse-neuroinflammatory impact of T cells in neurodegenerative diseases. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 1-10.

Souto, N. S., Claudia Monteiro Braga, A., Lutchemeyer de Freitas, M., Rechia Figuera, M., Royes, L. F. F., Schneider Oliveira, M., & Furian, A. F. (2018). Aflatoxin B1 reduces non-enzymatic antioxidant defenses and increases protein kinase C activation in the cerebral cortex of young rats. *Nutritional Neuroscience*, 21(4), 268-275.

Souza, C. F., Baldissera, M. D., Zeppenfeld, C. C., Descovi, S., Stefani, L. M., Baldisserotto, B., & da Silva, A. S. (2019). Oxidative stress mediated the inhibition of cerebral creatine kinase activity in silver catfish fed with aflatoxin B1-contaminated diet. *Fish physiology and biochemistry*, 45(1), 63-70.

Streit, E., Naehrer, K., Rodrigues, I., & Schatzmayr, G. (2013). Mycotoxin occurrence in feed and feed raw materials worldwide: long-term analysis with special focus on Europe and Asia. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2892-2899.

Subagio, A., & Morita, N. (2001). Instability of carotenoids is a reason for their promotion on lipid oxidation. *Food research international*, 34(2-3), 183-188.

Surmeier, D. J., Schumacker, P. T., Guzman, J. D., Ilijic, E., Yang, B., & Zampese, E. (2017). Calcium and Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications*, 483(4), 1013-1019.

Swerdlow, R. H. (2011). Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1812(12), 1630-1639.

Taeavernier, L., Bracke, N., Veryser, L., Wynendaele, E., Gevaert, B., Peremans, K., & De Spiegeleer, B. (2016). Blood-brain barrier transport kinetics of the cyclic depsipeptide mycotoxins beauvericin and enniatins. *Toxicology Letters*, 258, 175-184.

Tallima, H., & El Ridi, R. (2018). Arachidonic acid: physiological roles and potential health benefits—a review. *Journal of advanced research*, 11, 33-41.

Tao, Y., Xie, S., Xu, F., Liu, A., Wang, Y., Chen, D., & Yuan, Z. (2018). Ochratoxin A: Toxicity, oxidative stress and metabolism. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 320-331.

Tonshin, A. A., Teplova, V. V., Andersson, M. A., & Salkinoja-Salonen, M. S. (2010). The *Fusarium* mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis. *Toxicology*, 276(1), 49-57.

Urbaniak, M., Waśkiewicz, A., & Stępień, Ł. (2020). *Fusarium* cyclodepsipeptide mycotoxins: Chemistry, biosynthesis, and occurrence. *Toxins*, 12(12), 765.

Vaclavikova, M., Malachova, A., Veprikova, Z., Dzuman, Z., Zachariasova, M., & Hajslova, J. (2013). 'Emerging' mycotoxins in cereals processing chains: Changes of enniatins during beer and bread making. *Food chemistry*, 136(2), 750-757.

Vahidi-Ferdowsi, P., Mehrzad, J., Malvandi, A. M., & Hosseinkhani, S. (2018). Bioluminescence-based detection of astrocytes apoptosis and ATP depletion induced by biologically relevant level aflatoxin B1. *World mycotoxin journal*, 11(4), 589-598.

Van Bulck, M., Sierra-Magro, A., Alarcon-Gil, J., Perez-Castillo, A., Morales-Garcia, J.A. (2019). Novel approaches for the treatment of Alzheimer's and Parkinson's disease. *International Journal of Molecular Science*, 20 (3), 719.

Venkataramana, M., Nayaka, S. C., Anand, T., Rajesh, R., Aiyaz, M., Divakara, S. T., & Rao, P. L. (2014). Zearalenone induced toxicity in SHSY-5Y cells: the role of oxidative stress evidenced by N-acetyl cysteine. *Food and chemical toxicology*, 65, 335-342.

Von Tobel, J. S., Antinori, P., Zurich, M. G., Rosset, R., Aschner, M., Glück, F., & Monnet-Tschudi, F. (2014). Repeated exposure to Ochratoxin A generates a neuroinflammatory response, characterized by neurodegenerative M1 microglial phenotype. *Neurotoxicology*, 44, 61-70.

Waegemann, K., Popov-Čeleketić, D., Neupert, W., Azem, A., & Mokranjac, D. (2015). Cooperation of TOM and TIM23 complexes during translocation of proteins into mitochondria. *Journal of Molecular Biology*, 427(5), 1075-1084.

Wang, Q., Zhang, Y., Zheng, N., Guo, L., Song, X., Zhao, S., & Wang, J. (2019). Biological system responses of dairy cows to aflatoxin B1 exposure revealed with metabolomic changes in multiple biofluids. *Toxins*, 11(2), 77.

Wang, S., Yang, X., Liu, F., Wang, X., Zhang, X., He, K., & Wang, H. (2021). Comprehensive Metabolomic Analysis Reveals Dynamic Metabolic Reprogramming in Hep3B Cells with Aflatoxin B1 Exposure. *Toxins*, 13(6), 384.

Wang, X., Yu, H., Fang, H., Zhao, Y., Jin, Y., Shen, J., & Zhang, J. (2019). Transcriptional profiling of zearalenone-induced inhibition of IPEC-J2 cell proliferation. *Toxicon*, 172, 8-14.

Wang, Z., Cotney, J., & Shadel, G. S. (2007). Human mitochondrial ribosomal protein MRPL12 interacts directly with mitochondrial RNA polymerase to modulate mitochondrial gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12610-12618.

Wang, Z., Gao, Y., Huang, X., Huang, S., Yang, X., Wang, J., & Zheng, N. (2021). Metabolomics analysis underlay mechanisms in the renal impairment of mice caused by combination of aflatoxin M1 and ochratoxin A. *Toxicology*, 458, 152835.

Wei, C. C., Yang, N. C., & Huang, C. W. (2021). Zearalenone Induces Dopaminergic Neurodegeneration via DRP-1-Involved Mitochondrial Fragmentation and Apoptosis in a *Caenorhabditis elegans* Parkinson's Disease Model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(40), 12030-12038.

Wu, K., Jia, S., Zhang, J., Zhang, C., Wang, S., Rajput, S. A., & Qi, D. (2021). Transcriptomics and flow cytometry reveals the cytotoxicity of aflatoxin B1 and aflatoxin M1 in bovine mammary epithelial cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 209, 111823.

Xiao, Y., Xu, S., Zhao, S., Liu, K., Lu, Z., & Hou, Z. (2019). Protective effects of selenium against zearalenone-induced apoptosis in chicken spleen lymphocyte via an endoplasmic reticulum stress signaling pathway. *Cell Stress and Chaperones*, 24(1), 77-89.

Xie, H., Hu, J., Xiao, C., Dai, Y., Ding, X., & Xu, Y. (2017). Exploration of ZEA cytotoxicity to mouse endometrial stromal cells and RNA-seq analysis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 31(4), e21874.

Xu, N., Xiao, Y., Xie, Q., Li, Y., Ye, J., & Ren, D. (2021). Occurrence of aflatoxin B1 in total mixed rations and aflatoxin M1 in raw and commercial dairy milk in northern China during winter season. *Food Control*, 124, 107916.

Yabuzaki, J. (2017). Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms. Database, 2017.

Yang, S., Jin, H., & Zhao, Z. (2018). An ECV304 monoculture model for permeability assessment of blood-brain barrier. *Neurological research*, 40(2), 117-121.

Yang, X., Ali, S., Zhao, M., Richter, L., Schäfer, V., Schliehe-Diecks, J., & Scheu, S. (2022). The mycotoxin Beauvericin exhibits immunostimulatory effects on dendritic cells via activating the TLR4 signaling pathway. *BioRxiv*.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 1-11.

Yoon, S., Cong, W. T., Bang, Y., Lee, S. N., Yoon, C. S., Kwack, S. J., & Choi, H. J. (2009). Proteome response to ochratoxin A-induced apoptotic cell death in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurotoxicology*, 30(4), 666-676.

Yuan, J. F., Ji, H. H., Qiu, Z. J., & Wang, D. H. (2016). ECV304/C6 coculture model of the BBB coupled with LC-MS analysis for drug screening from Rhubarb extract. *Medicinal Chemistry Research*, 25(9), 1935-1944.

Zeferino, C. P., Wells, K. D., Moura, A. S. A. M. T., Murarolli, R. A., Rottinghaus, G. E., & Ledoux, D. R. (2016). Gene expression in the kidneys of broilers fed ochratoxin A for different time periods. *World Mycotoxin Journal*, 9(2), 257-268.

Zhang, B., Dai, Y., Zhu, L., He, X., Huang, K., & Xu, W. (2020). Single-cell sequencing reveals novel mechanisms of Aflatoxin B1-induced hepatotoxicity in S phase-arrested L02 cells. *Cell Biology and Toxicology*, 36(6), 603-608.

Zhang, B., Shen, X. L., Liang, R., Li, Y., Huang, K., Zhao, C., & Xu, W. (2014). Protective role of the mitochondrial Lon protease 1 in ochratoxin A-induced cytotoxicity in HEK293 cells. *Journal of Proteomics*, 101, 154-168.

Zhang, G. L., Song, J. L., Zhou, Y., Zhang, R. Q., Cheng, S. F., Sun, X. F., & Li, L. (2018). Differentiation of sow and mouse ovarian granulosa cells exposed to zearalenone *in vitro* using RNA-seq gene expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 350, 78-90.

Zhang, N. Y., Qi, M., Gao, X., Zhao, L., Liu, J., Gu, C. Q., & Qi, D. S. (2016). Response of the hepatic transcriptome to aflatoxin B1 in ducklings. *Toxicon*, 111, 69-76.

Zhang, R. Q., Sun, X. F., Wu, R. Y., Cheng, S. F., Zhang, G. L., Zhai, Q. Y., & Li, L. (2018). Zearalenone exposure elevated the expression of tumorigenesis genes in mouse ovarian granulosa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 356, 191-203.

Zhang, T. Y., Sun, X. F., Li, L., Ma, J. M., Zhang, R. Q., Li, N., & Shen, W. (2019). Ochratoxin A exposure impairs porcine granulosa cell growth via the PI3K/AKT signaling pathway. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(9), 2679-2690.

Zhang, X., Boesch-Saadatmandi, C., Lou, Y., Wolfram, S., Huebbe, P., & Rimbach, G. (2009). Ochratoxin A induces apoptosis in neuronal cells. *Genes & nutrition*, 4(1), 41-48.

Zhao, Y., Wang, K., Wang, W. L., Yin, T. T., Dong, W. Q., & Xu, C. J. (2019). A high-throughput SNP discovery strategy for RNA-seq data. *BMC genomics*, 20(1), 1-10.

Zinedine, A., & El Akhdari, S. (2021). Food safety and climate change: case of mycotoxins. In *Research anthology on food waste reduction and alternative diets for food and nutrition security* (pp. 39-62). IGI Global.

Zuberi, Z., Eeza, M. N., Matysik, J., Berry, J. P., & Alia, A. (2019). NMR-based metabolic profiles of intact zebrafish embryos exposed to aflatoxin B1 recapitulates hepatotoxicity and supports possible neurotoxicity. *Toxins*, 11(5), 258.

Zurich, M. G., & Honegger, P. (2011). Ochratoxin A at nanomolar concentration perturbs the homeostasis of neural stem cells in highly differentiated but not in immature three-dimensional brain cell cultures. *Toxicology letters*, 205(2), 203-208.





VNIVERSITAT (Q\*)  
D VALÈNCIA Facultat de Farmàcia

---

Departament de Medicina Preventiva i Salut Pública,  
Ciències de l'Alimentació, Toxicologia i Medicina Legal