



**Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Veterinarias**

**Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de  
DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**EFFECTOS DE LA INTOXICACION AGUDA POR MICOTOXINA T- 2 EN EL RATON.  
ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS, ULTRAESTRUCTURALES,  
INMUNOHISTOQUIMICOS Y LECTINHISTOQUIMICOS**

**AUTOR: QUIROGA, María Alejandra**

**DIRECTOR: PERFUMO, Carlos Juan**

**CODIRECTOR: IDIART, Julio Roberto**

**LUGAR DE TRABAJO: Instituto de Patología "Dr. B. Epstein"  
Servicio Central de Microscopía Electrónica  
Fac. de C. Veterinarias, U.N.L.P.**

**MIEMBROS DEL JURADO: CARFAGNINI, Julio César  
GODOY, Héctor M.  
SALA DE MIGUEL, Mauricia**

**Año 2002**

A Franco, Sofía y Pablo

## **Agradecimientos**

Deseo agradecer especialmente a todos aquellos que, de algún modo, colaboraron en la realización de este trabajo:

-A mis directores, Dr. Carlos J. Perfumo y Dr. Julio R. Idiart, quienes durante todo este tiempo me brindaron su asesoramiento y apoyo incondicional.

-Al Prof. Dr. Kunio Doi, del Departamento de Patología, Facultad de Agricultura, Universidad de Tokio, Japón, quien colaboró conmigo desde el principio, en la elección del tema a trabajar, en el aprendizaje de las técnicas de inmuno y lectihistoquímica y, aún en la distancia, supo acercar un consejo y una opinión siempre oportunos.

-Al Dr. S. Itagaki, quien me ayudó a dar los primeros pasos en el aprendizaje de las técnicas de microscopía electrónica. A él, mi recuerdo siempre.

-Al Dr. Miguel A. Risso por la paciencia demostrada y por su invaluable asesoramiento en la evaluación estadística de los datos presentados en este trabajo.

-A Pablo Nervi por su respaldo de siempre y porque, al cuidar de nuestros hijos, me facilitó disponer del tiempo y la serenidad suficientes para, finalmente, concluir este trabajo.

-A las Ht. Analía Catucci y María de los Angeles Sosa por su apoyo técnico y su buena disposición.

-Al Ht. Silvio Igal por su colaboración técnica y, fundamentalmente, por acompañarme durante este tiempo y regalarme su hermosa y valiosa amistad.

-Al Dr. Miguel A. Petruccelli por abrirme las puertas del Servicio Central de Microscopía Electrónica.

-A mis amigas Cecilia Venturini y Adriana Massone por estar siempre conmigo.

-A mi amigo Ignacio Aguirre por alentarme siempre.

-A Mariana Machuca y a mis compañeros de cátedra Cecilio Castro, Carolina Aralda y Lorena Díaz por su optimismo y por alegrar mis jornadas de trabajo.

-A mi hermana Patricia por su apoyo moral.

**Citas bibliográficas correspondientes a las publicaciones parciales del trabajo:**

- QUIROGA, M.A.; DOI, C.; HAN, J-S.; DOI, K.; AKAI, H.; TAMURA, K. (1991) Acute hepatotoxicity of T-2 toxin in mice. J. Toxicol. Pathol. 4: 35-44.
  
- QUIROGA, M.A.; ITAGAKI, S.; DOI, K. (1993) Early ultrastructural changes of thymocytes in T-2 toxicated mice. J. Toxicol. Pathol. 6: 109-112.
  
- QUIROGA, M.A.; RISSO, M.A.; PERFUMO, C.J.; IDIART, J.R.; OHTSUKA, R.; DOI, K. (2000) Sequence of and regional difference in apoptotic index in the mouse gastrointestinal mucous epithelia after T-2 toxin inoculation. J. Toxicol. Pathol. 13: 193-196.

<b>INDICE DE CONTENIDOS</b>	<b>Página</b>
<b>-TITULO</b>	<b>1</b>
<b>-PALABRAS CLAVES</b>	<b>1</b>
<b>-RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>-TITLE</b>	<b>3</b>
<b>-KEY WORDS</b>	<b>3</b>
<b>-SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>-INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
<b>A) Consideraciones generales</b>	<b>5</b>
<b>B) Hongos del género Fusarium. Presentación y características de desarrollo.</b>	<b>8</b>
<b>C) Tricotecenos. Estructura química, efectos adversos, modo de acción y biotransformación.</b>	<b>9</b>
<b>D) Micotoxina T-2</b>	<b>16</b>
<b>E) Detección de micotoxinas</b>	<b>18</b>
<b>F) Técnicas de lectinohistoquímica</b>	<b>19</b>
<b>G) Técnicas de inmunohistoquímica</b>	<b>21</b>
<b>H) Objetivos</b>	<b>23</b>

**-SECCION I: ESTUDIOS HISTOPATOLÓGICO Y ULTRAESTRUCTURAL**

<b>◆ MATERIALES Y METODOS</b>	<b>24</b>
*Animales	24
*Micotoxina	24
*Diseño experimental	24
*Estudio histopatológico	25
*Estudio ultraestructural	26
*Análisis estadístico	26
<b>◆ RESULTADOS</b>	<b>30</b>
*Análisis del peso corporal y del peso de los órganos	30
*Examen con microscopio óptico	31
-Figuras 6 a 19	40
-Tablas 1 a 15	54
*Examen con microscopio electrónico	69
-Figuras 20 a 33	73
<b>◆ DISCUSION</b>	<b>89</b>
<b>◆ CONCLUSIONES</b>	<b>106</b>

**-SECCION II: ESTUDIO LECTINHISTOQUIMICO**

<b>◆ MATERIALES Y METODOS</b>	<b>107</b>
*Animales, micotoxina y diseño experimental	107

* <b>Lectinas</b>	<b>107</b>
* <b>Procedimiento</b>	<b>108</b>
* <b>Análisis estadístico</b>	<b>110</b>
◆ <b>RESULTADOS</b>	<b>111</b>
- <b>Figuras 35 y 36</b>	<b>113</b>
- <b>Tabla 16</b>	<b>115</b>
◆ <b>DISCUSION</b>	<b>116</b>
◆ <b>CONCLUSIONES</b>	<b>121</b>
<b>-SECCION III: <u>ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO</u></b>	
<b>A) <u>INMUNOMARCACION DE MICOTOXINA T-2 EN CORTES DE TEJIDOS</u></b>	
◆ <b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>122</b>
* <b>Animales, micotoxina y diseño experimental</b>	<b>122</b>
* <b>Procedimiento</b>	<b>122</b>
◆ <b>RESULTADOS</b>	<b>123</b>
◆ <b>DISCUSION</b>	<b>123</b>
<b>B) <u>INMUNOMARCACION DE CELULAS APOPTOTICAS EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON MICOTOXINA T-2</u></b>	
◆ <b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>125</b>
◆ <b>RESULTADOS</b>	<b>126</b>
- <b>Figuras 37 a 40</b>	<b>127</b>
◆ <b>DISCUSION</b>	<b>131</b>



◆ CONCLUSIONES	133
-CONCLUSIONES GENERALES	134
-BIBLIOGRAFIA	136

**EFFECTOS DE LA INTOXICACION AGUDA POR MICOTOXINA T-2 EN EL RATON.**  
**ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS, ULTRAESTRUCTURALES,**  
**INMUNOHISTOQUIMICOS Y LECTINHISTOQUIMICOS**

**Palabras clave:** micotoxina T-2 – ratón – patología – lectinhistoquímica – inmunohistoquímica

**RESUMEN**

Con el fin de conocer los efectos de la intoxicación aguda por una dosis subletal de micotoxina T-2, a 28 ratones ICR:CD1 (**Grupo T**) se les administró 10 mg de micotoxina T-2 por Kg de peso vivo por intubación gástrica. Otro grupo similar (**Grupo C**) fue utilizado como control. Los animales se sacrificaron a las 8, 16, 24 y 48 HPA. Se obtuvieron muestras de diversos órganos, las que se procesaron para estudios histopatológicos, ultraestructurales, lectinhistoquímicos e inmunohistoquímicos (métodos ABC y TUNEL). Se realizó el análisis estadístico (prueba de Fisher) del peso corporal y de los órganos, así como de las lesiones microscópicas y de los resultados del estudio lectinhistoquímico. Los resultados del estudio inmunohistoquímico (método TUNEL) se evaluaron mediante la prueba t de Student. La micotoxina T-2 causó alteraciones morfológicas celulares y subcelulares en estómago, intestino delgado y grueso, páncreas, hígado, timo, bazo y linfonódulo mesentérico. Las lesiones más evidentes fueron la necrosis de las células epiteliales de las glándulas fúndicas del estómago y de las criptas del intestino con reducción del porcentaje de mitosis y la necrosis, apoptosis y disminución en el número de células linfoides del timo, linfonódulo

mesentérico, bazo y placas de Peyer. Las lesiones más significativas se observaron a las 8 y 16 HPA en todos los órganos. Con excepción del timo, el resto de los órganos mostró una tendencia a la normalidad hacia el final del período experimental. No hubo diferencias en el patrón de afinidad a las lectinas entre los **Grupos T y C**. No se identificaron la micotoxina T-2 o sus derivados en los cortes de estómago, intestino, hígado y riñón mediante la técnica de ABC. El método TUNEL resultó útil en la identificación de células epiteliales apoptóticas en los órganos del tracto gastrointestinal. En general, se observó un incremento en la tasa de apoptosis a las 8 y 16 HPA, en correspondencia con los hallazgos histopatológicos.

**EFFECTS OF ACUTE TOXICITY OF T-2 TOXIN IN MICE: HISTOPATHOLOGICAL,  
ULTRASTRUCTURAL, IMMUNOHISTOCHEMICAL AND LECTINHISTOCHEMICAL  
STUDIES**

**Key words:** T-2 mycotoxin – mice – pathology – immunohistochemistry -  
lectinhistochemistry

**SUMMARY**

To study the effects of acute toxicity by a sublethal dose of T-2 mycotoxin, twenty eight ICR:CD-1 mice (**T-Group**) were administered orally with 10 mg/kg body weight of T-2 toxin. Other similar group of mice (**C-Group**) were used as a control. Mice were sacrificed at 8, 16, 24 and 48 hours post-administration (HPA). Samples from several organs were processed for histopathological, ultrastructural, lectinhistochemical and immunohistochemical studies. Body and organs weight, microscopic and lectinhistochemical findings were analyzed by statistical methods (Fisher's test). Immunohistochemical results (TUNEL method) were evaluated by Student's t-test. T-2 mycotoxin induced histological and subcellular changes in stomach, small and large intestine, pancreas, liver, thymus, spleen and mesenteric lymph node. The main lesions consisted in necrosis of epithelial cells of the fundic glands and intestinal crypts with a decrease of mitotic activity, and necrosis, apoptosis and depletion of lymphoid cells from thymus, lymph node, spleen and Peyer's patches. All the organs showed the most significant lesions at 8 and 16 HAI. Most organs, except for the thymus, returned almost to normal at the end of the experimental period. There

were no specific differences in lectins expression of binding affinity between **C** and **T Groups**. T-2 mycotoxin or derivatives were not identified using ABC method. Epithelial apoptotic cells in the gastrointestinal tract were recognized by the TUNEL method. Apoptotic index increased at 8 and 16 HAI. This result was concurrent with histopathological findings.

## **◆INTRODUCCION**

### **A) Consideraciones generales.**

Las micotoxinas constituyen un grupo de metabolitos tóxicos producidos por diversas especies de hongos relacionados con el deterioro de los alimentos y de los forrajes. Estos hongos, componentes de la microflora del aire y del suelo, bajo condiciones favorables para su desarrollo pueden proliferar y producir toxinas en sustratos tales como granos de cereales y oleaginosas, forraje verde o ensilado y alimentos en general. Estos metabolitos ejercen su efecto principalmente por ingestión, provocando en el hombre y en los animales disturbios en la salud denominados genéricamente micotoxicosis (110).

Desde hace siglos se conocen las alteraciones en el sabor y en la calidad de los alimentos debidas a la presencia de hongos. Ya desde la época de la antigua Grecia hay referencias sobre el uso del centeno contaminado en la elaboración de harinas. Así también, en el Antiguo Testamento de la Biblia, se discuten supuestos casos de ergotismo. Por otro lado, existe información sobre numerosos casos de gangrena seca y transtornos nerviosos que afectaron al hombre en Europa desde el siglo XI al XVI, y que fueron atribuidos al consumo de alimentos invadidos por hongos (5, 108, 110). Pero, sólo alrededor del año 1850, se logró establecer una relación entre la ingestión de grano visiblemente enmohecido y la manifestación clínica de enfermedad, demostrándose que centeno infectado con *Claviceps purpurea* fue causa de ergotismo (5). Pese a toda esta información, la comunidad científica permaneció desinteresada en las micotoxinas hasta mediados del siglo XX, cuando la ingestión de pan contaminado con *Fusarium sporotrichioides* produjo, en el hombre, una enfermedad llamada aleuquia

tóxica alimentaria (ATA) (55, 108, 110). En el mismo período, numerosos equinos enfermaron y murieron luego del consumo de alimento infectado por *Stachybotrys alternans* (108). A partir de 1960, con la identificación de las aflatoxinas como causa de muerte en 100.000 pavipollos, en Gran Bretaña, se dirigió la atención hacia las micotoxinas como problema en Medicina Veterinaria, reconociéndose así los efectos tóxicos resultantes de la ingestión de alimentos contaminados con hongos. (108).

En general, la mayoría de los hongos toxigénicos se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo. Con todo, se observa un predominio regional en la presentación de determinadas micotoxicosis debido a la preferencia, de algunos hongos, por un sustrato específico y a ciertas condiciones necesarias para la producción de toxinas. (108, 141). Son diversas las condiciones ambientales que influyen en el desarrollo de los hongos y en su capacidad para producir altos tenores de toxinas, tales como humedad relativa ambiente, contenido de humedad del grano, temperatura, disponibilidad de oxígeno, luz y microflora competitiva. Algunos hongos elaboran sus toxinas con temperaturas próximas a 0°C mientras otros lo hacen con temperaturas cercanas a 25°C. (23, 109). Bajo condiciones de laboratorio, al menos 300 micotoxinas han sido producidas por cultivos puros de hongos y se han caracterizado químicamente. Afortunadamente, sólo alrededor de 20 de estas toxinas son conocidas como contaminantes naturales de alimentos y causales de enfermedad en el hombre y en los animales. Estas micotoxinas son principalmente producidas por cinco géneros de hongos: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Claviceps* (141).

La susceptibilidad de los animales a las micotoxinas varía según la especie animal, sexo, edad, cantidad de micotoxina consumida, toxicidad del compuesto y presencia de más de una micotoxina en el alimento (109, 141). En general, los animales en crecimiento son más susceptibles a las micotoxinas que los adultos siendo, a su vez, las aves más sensibles que los mamíferos.

Los efectos adversos pueden presentarse bajo tres formas:

- 1) Micotoxicosis primaria aguda: cuando las micotoxinas se consumen en moderadas o grandes concentraciones, produciendo sus efectos sobre órganos y tejidos específicos según la toxina actuante (Por ejemplo: hígado, riñón, mucosas oral y gástrica o tracto reproductivo).
- 2) Micotoxicosis primaria crónica: resultante del consumo de niveles bajos de micotoxinas. Frecuentemente se registran disminución de la velocidad de crecimiento, de la conversión alimenticia y de la eficiencia reproductiva.
- 3) Micotoxicosis secundaria: cuando los niveles de micotoxinas consumidas son aún menores, observándose que no causan una manifestación clínica evidente. Sin embargo, su importancia radica en que producen una interferencia en los mecanismos de resistencia natural y una disminución de la respuesta inmune, provocando mayor predisposición a infecciones intercurrentes.

En general, las micototoxicosis de importancia clínico-patológica se presentan bajo las formas 2 y 3 (88, 95, 109, 162, 166).



## **B) Hongos del género *Fusarium*. Presentación y características de desarrollo.**

Diferentes especies de hongos del género *Fusarium*, comúnmente halladas en la naturaleza, son capaces de producir micotoxinas. Se encuentran presentes, cumpliendo su ciclo de vida, sobre diversos sustratos (por ejemplo: plantas en crecimiento o granos) y ocasionan numerosas enfermedades en diversos cultivos (98). También alteran la calidad comercial de granos, frutos, alimentos y subproductos utilizados por el hombre y los animales (53, 129). En la Argentina, las especies aisladas más frecuentemente como contaminantes de cultivos y muestras de alimentos son: *F. graminearum*, *F. tricinctum*, *F. poae*, *F. heterosporum* y *F. equiseti*. Mediante pruebas de patogenicidad realizadas en animales de laboratorio se ha confirmado la toxigenicidad de las especies citadas (75, 76).

Las especies del género *Fusarium* desarrollan en todo tipo de suelo, ya sea como saprófitos o parásitos de tejidos vegetales (principalmente tejidos seniles). El crecimiento de todas las especies de *Fusarium* se asocia a condiciones de alta humedad. No se conocen datos referentes a la formación de toxinas, por estos hongos, en regiones áridas o semiáridas. Otros dos factores que influyen en la elaboración de toxinas por las especies del género *Fusarium* son la temperatura y el sustrato sobre el que el hongo desarrolla (98). La mayoría de las especies presenta óptimo crecimiento micelial entre 20 y 24 °C (*F. culmorum*, *F. moniliforme*) o entre 25 y 30 °C (*F. oxysporum*, *F. solani*). Sin embargo, el hecho más importante es que todas estas especies son capaces de desarrollar con temperaturas entre 12 y 20 °C (98). Se ha establecido, en experiencias realizadas sobre *F. poae* y *F. tricinctum*, que existe

marcada influencia de la temperatura sobre la esporulación, crecimiento micelial y toxicidad (63, 74, 98). La mayor toxicidad se obtuvo con cultivos incubados a 8 °C y en oscuridad total, con escaso crecimiento micelial y alta esporulación (74).

Se considera que los granos de cereales afectados por *Fusarium* son la fuente más importante de toxinas para el hombre y los animales. En climas templados, los granos de trigo, cebada, avena, centeno y mijo resultan mayormente expuestos a la invasión por *Fusarium* y a la producción de sus toxinas. En climas cálidos el arroz y, ocasionalmente, el sorgo ofrecen un buen sustrato para el desarrollo del hongo y sus toxinas, mientras que el maíz es afectado tanto en climas templados como cálidos (98).

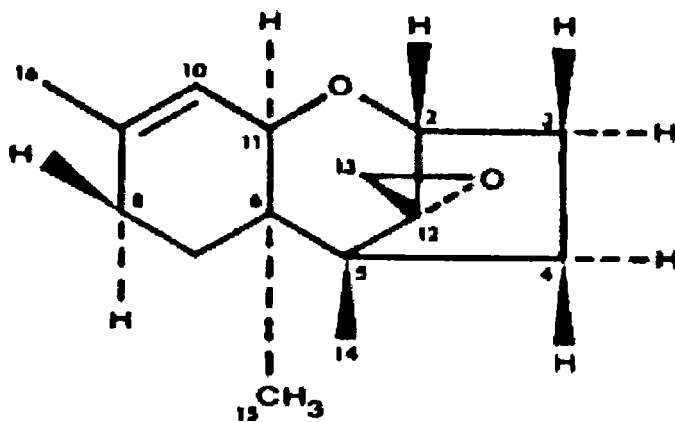
Los metabolitos tóxicos más importantes producidos por el género *Fusarium* son tricotecenos, zearalenona y fumonisinas (17, 18).

### **C) Tricotecenos. Estructura química, efectos adversos, modo de acción y biotransformación.**

Los tricotecenos constituyen un grupo de metabolitos tóxicos biológicamente activos producidos naturalmente no sólo por especies del género *Fusarium*, sino también por los géneros *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma* y *Stachybotrys* (84, 87, 98, 124, 141). El nombre de tricotecenos se debe a la presencia de un esqueleto tetracíclico de 12-13 epoxitricotec-9-ene (Fig. 1) (17, 109). Se conocen más de 150 tricotecenos (Pittet 1998). Principalmente tres de ellos, deoxinivalenol (DON), micotoxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS), son conocidos como contaminantes de granos y causantes de enfermedad en los animales y en el hombre (109, 153, 158, 168). En el hombre, los tricotecenos han sido considerados como la principal causa de

ATA, enfermedad caracterizada por vómitos, necrosis cutánea, faringitis necrótica, hemorragias múltiples, leucopenia y agotamiento de la médula ósea. Este cuadro se presentó en Oremburgo (Rusia), entre los años 1942 y 1947, afectando a más del 10% de la población, luego de la ingestión de pan contaminado con hongos del género *Fusarium* (55, 156). Desde esta fecha han existido numerosas sospechas de intoxicación por tricotecenos en el hombre y en los animales (64, 154, 155, 156). Por otra parte, la sospecha que la micotoxina T-2 y tricotecenos relacionados hayan sido empleados como arma química ("lluvia amarilla") en el sudeste asiático (47, 122) ha provocado un gran avance en las investigaciones toxicológicas, principalmente referidas a la micotoxina T-2.

**Figura 1 - Tricotecenos**

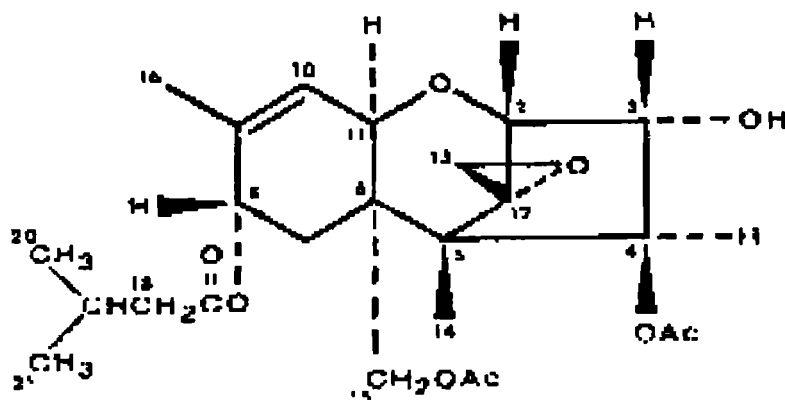


Sobre la base de su estructura química los tricotecenos se clasifican en cuatro grupos:

-grupo A: solubles en solventes tales como acetato de etilo y éter dietílico. Las sustancias que pertenecen a este grupo se caracterizan por presentar un sustituyente

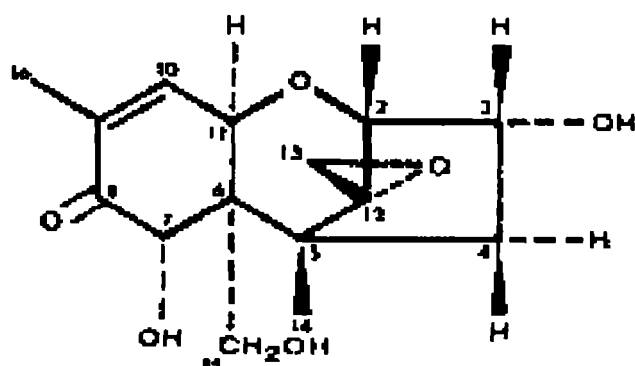
en el C8 distinto de un grupo carbonilo, pudiendo presentar en su estructura un hidrógeno, un grupo hidroxilo o ésteres del hidroxilo. Aquí se incluyen a las micotoxinas T-2, HT-2, T-2 tetraol, neosolaniol y DAS (Fig. 2).

**\*Figura 2 - Micotoxina T-2**



-grupo B: solubles en solventes muy polares tales como metanol y etanol. Todas estas toxinas tienen un grupo carbonilo en el C8. A este grupo pertenecen las toxinas nivalenol (NIV), fusarenon x (Fx) y DON (Fig. 3).

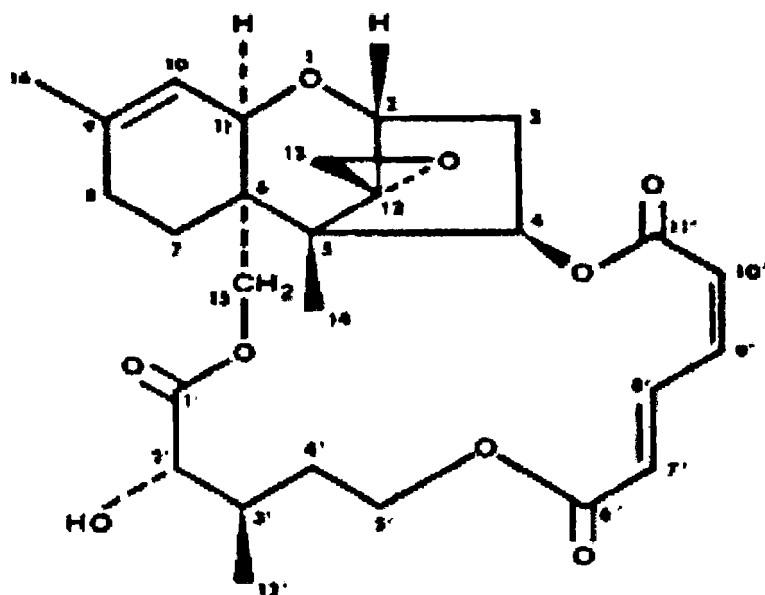
**Figura 3 - Deoxinivalenol**



-grupo C: comprende los tricotecenos macrocíclicos tales como verrucarina A y satratoxina A. Se caracterizan por un segundo grupo epóxido entre C7 y C8 o entre C9

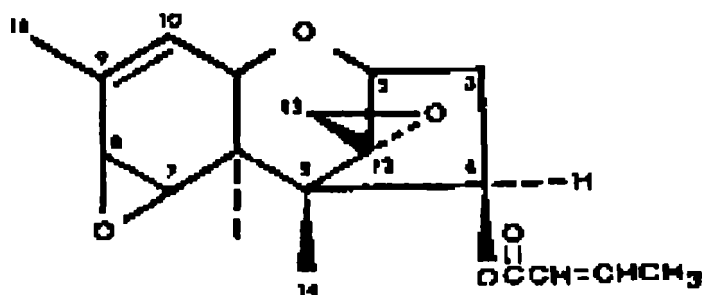
y C10 (Fig. 4).

**\*Figura 4 - Verrucarina A**



-grupo D: este grupo contiene un anillo macrocíclico complejo que se une por ambos extremos al C4 y al C15 a través de dos uniones éster. La crotocina es el único miembro de este grupo (Fig. 5) (17, 156, 157).

**\*Figura 5 - Crotocina**



Pruebas realizadas en cultivos celulares han demostrado que la toxicidad de los tricotecenos depende de la presencia del grupo 12,13-epoxi-, observándose que las

moléculas que carecen de este grupo no son tóxicas (158). Los efectos toxicológicos y la citotoxicidad son mayores en los tricotecenos macrocíclicos (grupos C y D) seguidos por las toxinas de los grupos A y B. (126, 152, 157, 158).

Los efectos adversos de una micotoxicosis resultan de la interacción de la micotoxina original (o metabólicamente modificada) con moléculas funcionales y organelas subcelulares en la célula animal. Las toxicosis causadas por tricotecenos se caracterizan clínicamente por modificaciones en el comportamiento, vómitos, rechazo del alimento, diarrea, necrosis cutánea, inflamación y hemorragias en intestino y músculo, ausencia de coordinación muscular, depresión en la función de la médula ósea y destrucción celular en el timo, bazo y otros órganos con células en rápida división. La naturaleza de la respuesta a los distintos tricotecenos es similar, aunque la severidad varía de acuerdo con la especie animal, potencia y cantidad de la toxina y vía de administración (94, 119, 128, 137, 158). En principio, los animales jóvenes o inmaduros son más susceptibles que los adultos, no existiendo diferencias de consideración entre machos y hembras (156, 157). En general, la concentración de los tricotecenos tóxicos hallados en granos contaminados naturalmente es baja como para desencadenar una toxicosis clínicamente aparente. Como sucede con otras micotoxinas, la ingestión subletal de tricotecenos puede producir desórdenes inmunológicos y metabólicos de curso subclínico (128).

Estas micotoxinas aumentan la permeabilidad de la pared de los vasos sanguíneos y del epitelio de la mucosa intestinal, con pérdida de líquido hacia la luz del intestino y, eventualmente, diarrea. También hay un aumento de la permeabilidad vascular luego de la aplicación de la toxina en la piel. Estos mecanismos pueden

asociarse con la injuria de las biomembranas de las células de los órganos blanco (158). El hígado es otro de los órganos afectados por los tricotecenos. Se ha observado que existe una inmediata asociación de la micotoxina T-2 y sus metabolitos con la membrana plasmática celular, el retículo endoplásmico, las mitocondrias y el núcleo (137, 157). También se han descrito lesiones microscópicas cardíacas, relacionadas con un aumento en la entrada de calcio dentro del cardiomiocito (99). Por otro lado, se ha señalado que la micotoxina T-2 y sus metabolitos deprimen la blastogénesis inducida por sustancias mitógenas, en linfocitos T y B (29, 101), mientras que la destrucción de las células progenitoras hematopoyéticas de la médula ósea (103), parece explicar los desórdenes hematológicos que tienen lugar en la intoxicación por esta micotoxina. Además, la presencia de alteraciones en el comportamiento, pérdida del apetito, falta de coordinación muscular y vómitos ya mencionados, se atribuyen a cambios neuroquímicos en el cerebro generados por estas micotoxinas (137).

El modo de acción de los tricotecenos no ha sido totalmente dilucidado. Se considera que son potentes inhibidores de la síntesis proteica celular y se citan como causa de ruptura del ADN celular y de inhibición de su síntesis. La inactivación de la síntesis proteica en las etapas de iniciación y terminación es el resultado de la unión de los tricotecenos a elementos de la estructura ribosomal (157, 158, 159). La susceptibilidad de las células a los tricotecenos depende principalmente de la cantidad de polisomas libres en el citoplasma. Las células que se regeneran a partir de la proliferación de células germinales indiferenciadas y/o de células blásticas (por ej. células linfoides, eritroides y de las criptas intestinales) poseen un gran número de polisomas libres y son mucho más sensibles que aquellas células de órganos

parenquimatosos (por ej. hígado, riñón y páncreas) que carecen de células indiferenciadas con capacidad proliferativa. Probablemente, el daño en los polisomas ligados a estructuras de membrana sea más fácilmente reparado que el producido en los polisomas libres. De igual modo, en el primer caso, el bloqueo de la síntesis proteica puede que sea superado sin consecuencias serias (146). Con respecto al daño que los tricotecenos provocan en el ADN celular, se desconocen los mecanismos del efecto inhibitorio (157). En la actualidad, se considera que la apoptosis es una de las manifestaciones morfológicas de la muerte celular observada en esta intoxicación. De todos modos, aún no está claro cuál es el mecanismo por el que la apoptosis ocurre (70, 71, 72, 73, 114, 117, 133, 134).

En relación a la **biotransformación** de los tricotecenos, una vez incorporados por el organismo animal, los datos experimentales sugieren que la mayoría de estas micotoxinas (principalmente micotoxina T-2 y DAS) son rápidamente absorbidas, metabolizadas hasta compuestos no tóxicos y eliminadas, sin que se haya demostrado la presencia de metabolitos tóxicos en niveles significativos, transcurridas las 24-48 horas posteriores a su ingestión, en carne, leche o huevos (33, 84, 137, 159). En general, los tricotecenos son metabolizados en dos fases, como sucede con otros xenobióticos. Las reacciones enzimáticas principales ocurren durante la **fase I**: deacetilación (hidrólisis), hidroxilación (oxidación) y de-epoxidación (reducción). En los dos primeros caminos las enzimas de los microsomas hepáticos juegan un importante papel, mientras que la de-epoxidación es llevada a cabo por la microflora intestinal, siendo una de las principales vías de detoxificación (68, 137, 158, 159). De las reacciones **fase II**, tiene importancia la conjugación con ácido glucurónico. Los



glucurónidos formados son, en su mayoría, excretados con la bilis en el tracto gastrointestinal (68).

#### **D) Micotoxina T-2**

La micotoxina T-2 es un metabolito producido por diferentes especies de *Fusarium*, principalmente *F. tricinctum*. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, hallándose presente como contaminante del maíz, soja, trigo y avena (136). Dentro del grupo de los tricotecenos, la micotoxina T-2 se caracteriza por sus efectos radiomiméticos, observándose que provoca un marcado daño sobre las células de rápida división del tracto gastrointestinal, bazo, timo, linfonódulos, médula ósea y testículos en diferentes especies animales (65). Se han descrito cuadros de intoxicación por micotoxina T-2, en casos de campo y experimentales, en felinos (125), bovinos (49), porcinos (106, 161, 164), pollitos y gallinas (11, 12, 46, 166, 167), ratas (32, 79), ratones (43, 44, 130), cobayos (22) y conejos (3, 91).

En ratones, la micotoxina T-2 ha sido administrada siguiendo distintas vías y en dosis variables, únicas o repetidas. Los ratones que recibieron la micotoxina T-2 por vías inhalatoria, tópica, intraperitoneal y parenteral presentaron lesiones de variada intensidad según las dosis administradas y el tiempo transcurrido luego de la exposición a la micotoxina (39, 127, 130, 148). Independientemente de la vía de administración, las lesiones más evidentes se observaron en todos los tejidos linfoides, consistiendo principalmente en necrosis y disminución del número de linfocitos, tanto en las zonas T como en las B dependientes. En el timo se han descrito picnosis y

cariorraxis en los linfocitos corticales, con disminución en el espesor de la corteza (39, 133). En el bazo, la necrosis linfocitaria comprometió los folículos linfoides y el área de linfocitos periarteriolares (39, 133). También fue evidente la necrosis de las células de las placas de Peyer intestinales (72). En médula ósea, animales tratados con micotoxina T-2 evidenciaron una reducción en el número de las células precursoras de las series granulocítica y megacariocítica (43) y una inhibición en la capacidad clonogénica de las células progenitoras de las líneas granulocítica-monocítica (26). Por otro lado, se han descrito lesiones en el tracto gastrointestinal de ratones inoculados con micotoxina T-2. En estómago se observó necrosis del epitelio de revestimiento y de las células glandulares (67). En intestino fue característica la necrosis de las células epiteliales de las criptas de Lieberkühn (130, 148). La descripción de lesiones en otros órganos de ratón, tales como piel, hígado y glándula adrenal varía según los autores. Ueno y col. (152) compararon el efecto dermonecrótico de varios tricotecenos sobre la piel de ratones, conejos y cobayos. En glándula adrenal de ratón se han descrito áreas de necrosis extensa en las células de la zona fasciculada, con pequeños focos de mineralización y células neutrofílicas (148). Si bien distintos autores no mencionan la ocurrencia de lesión hepática en ratones intoxicados con micotoxina T-2 (43, 67, 148), Mollenhauer y col. (85) han observado lesiones ultraestructurales consistentes en proliferación del retículo endoplásmico liso y pérdida de la normal distribución del retículo endoplásmico rugoso, condensación de la matriz mitocondrial y disminución de los gránulos de glucógeno (85).

Por otro lado, existen numerosos estudios referentes al efecto inmunomodulador de la micotoxina T-2 en el ratón. Trabajos realizados indican que esta micotoxina actúa

deprimiendo la respuesta inmune mediada por células (20, 31, 48). De este modo, se ha observado un descenso en la resistencia del huésped frente a ciertas enfermedades infecciosas. En ratón, la exposición repetida a la micotoxina T-2 condujo a un aumento de la susceptibilidad a la infección por *Mycobacterium bovis*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y virus herpes simplex tipo 1. En algunos casos, el efecto inmunomodulador dependió directamente del momento de exposición a la micotoxina (93). Además, la administración de dosis bajas y repetidas de micotoxina T-2 a ratones con infección crónica por *Toxoplasma gondii* provocó la reagudización de la infección (162).

#### **E) Detección de micotoxinas**

En el diagnóstico de cuadros de micotoxicosis numerosos factores pueden actuar como limitantes, tales como la ausencia de signos clínicos específicos de toxicidad, la imposibilidad de obtener muestras del alimento contaminado con micotoxinas al momento de la presentación del cuadro, el uso de métodos analíticos inadecuados y la presencia de más de una toxina (45). Para la detección de las micotoxinas producidas por el género *Fusarium* puede recurrirse a métodos biológicos, físico-químicos, químicos e inmunoquímicos. Entre las pruebas biológicas se citan, especialmente para tricotecenos, las pruebas sobre piel de conejo o en patitos de un día, determinando la patogenicidad sobre la base de la intensidad de la lesión producida (77, 135) o también mediante la utilización de huevos embrionados (111). Entre los métodos físico-químicos se encuentran algunas técnicas de alta sensibilidad y especificidad tales como la cromatografía gas-líquido (GLC), cromatografía líquida de

alta presión (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y espectrometría de masa (MS) (98, 105). Recientemente se han desarrollado técnicas inmunoquímicas que pueden ser utilizadas en el diagnóstico de las micotoxicosis. En la actualidad, se dispone de anticuerpos comerciales contra varias micotoxinas. Esto ha permitido la aplicación de distintas técnicas inmunoquímicas, tales como radioinmunoensayo (RIA) y prueba de ELISA, en la detección de algunas micotoxinas y sus metabolitos en alimentos y fluidos corporales (14).

#### **F) Técnicas de lectin histoquímica**

Los carbohidratos se hallan ampliamente distribuidos en los tejidos animales. Las membranas celulares contienen glucoconjugados en la forma de glucolípidos o glucoproteínas. Algunos de estos carbohidratos son de localización extracelular, intramembranosa o se encuentran formando parte de moléculas intracitoplásmicas. De este modo actúan como receptores, ligan y transportan moléculas o constituyen componentes estructurales de la membrana celular (21). Estudios realizados en los últimos años han demostrado que los hidratos de carbono cumplen, además, importantes funciones biológicas, tales como participación en los procesos de diferenciación celular, adhesión y activación celular en la inflamación, en los procesos de metástasis tumorales y en los fenómenos de apoptosis (78, 90).

Existen condiciones patológicas que alteran el metabolismo de los glucoconjugados celulares. Diversos autores han estudiado la modificación de estos glucoconjugados en determinados procesos inflamatorios intestinales y neoplásicos (21, 78).

Los avances en el conocimiento de la localización, síntesis y funciones de los complejos glucoconjugados se han basado en el desarrollo de técnicas que han permitido una mejor caracterización, purificación y análisis estructural de los componentes hidrocarbonados. Entre esas técnicas se encuentran las que utilizan a las lectinas como herramienta para el estudio de los glucoconjugados solubles y celulares (21).

Las lectinas son glucoproteínas o hidratos de carbono unidos a proteínas, de origen no inmune, que tienen la propiedad de aglutinar células o precipitar glucoconjugados. Su valor como método histoquímico reside en su habilidad para localizar, identificar y distinguir hidratos de carbono tisulares con gran sensibilidad y especificidad, tanto en tejidos sanos como enfermos. En los primeros, las técnicas de lectinhistoquímica se aplican al estudio de los procesos de reconocimiento, maduración, diferenciación y especialización celular, existiendo marcada especificidad por ciertos receptores de célula, tejido y especie animal. El reconocimiento celular es un paso inicial en los procesos de interacción celular tales como fertilización, embriogénesis, migración celular, organogénesis e infección microbiana. En los tejidos patológicos, se han logrado avances más espectaculares principalmente en el estudio de las inflamaciones crónicas, displasias y neoplasias de los sistemas digestivo, respiratorio y génito-urinario (21, 66, 90). En medicina veterinaria, las técnicas de lectinhistoquímica se han utilizado a fin de estudiar la variación en la presentación y distribución de los hidratos de carbono, tanto en tejidos animales normales como patológicos, y sus efectos en la fisiología celular (38, 51, 81, 102, 107, 115).

En el caso de la intoxicación con tricotecenos, son escasos los datos referentes

a los cambios histoquímicos que ocurren en las glucoproteínas de los tejidos afectados. En ratas que recibieron DAS durante dos días se observó que la micotoxina indujo cambios en la reactividad de las glucoproteínas gástricas, sugiriendo ésto una anormal síntesis o secreción (86).

### **G) Técnicas de inmunohistoquímica**

Son escasas las referencias sobre la utilización de anticuerpos contra micotoxinas en órganos y tejidos animales (14, 115). En ratones se han usado anticuerpos anti-micotoxina T-2 a fin de demostrar, mediante el método peroxidasa-anti-peroxidasa (PAP), la distribución de la toxina en animales intoxicados experimentalmente (67).

Por otro lado, las técnicas de inmunohistoquímica resultan apropiadas para estudiar las características de la muerte celular provocada por algunas micotoxinas.

La muerte celular puede ser el resultado de un proceso patológico o la consecuencia de procesos fisiológicos. En las células eucarióticas se distinguen dos formas de muerte con manifestaciones morfológicas y bioquímicas características.

La necrosis, también llamada muerte celular "accidental", es el modo más frecuentemente visto, consecuencia de una injuria repentina y severa. En la necrosis se suceden cambios tempranos en la forma y función mitocondriales, acompañados de pérdida en la integridad de la membrana celular. El contenido celular se libera al tejido circundante desencadenando una respuesta inflamatoria evidente. En definitiva, la célula pierde rápidamente su capacidad de mantener la homeostasis.

La segunda forma de muerte celular es la apoptosis, originariamente llamada

muerte celular “fisiológica” o “programada” en la consideración que la muerte ocurría en respuesta a un estímulo fisiológico identificable. La apoptosis, generalmente, afecta a células individuales y se caracteriza por la rápida reducción en el volumen celular, pérdida de las microvellosidades y de los medios de unión y posterior fragmentación celular dando origen a los cuerpos apoptóticos. Estos, son fragmentos celulares revestidos de membrana que contienen segmentos nucleares de cromatina densa con forma de media luna y organelas intactas. La fragmentación ocurre sin liberación de los componentes celulares. Los cuerpos apoptóticos son rápidamente fagocitados y no se observa respuesta inflamatoria (16, 24, 132, 147, 151). La condensación de la cromatina que caracteriza la apoptosis es una consecuencia de la fragmentación internucleosomal del ADN. En la necrosis también hay segmentación del ADN, pero como consecuencia de la acción de enzimas lisosomales. Por lo tanto, no existe un patrón de ruptura.

El proceso de apoptosis puede ser desencadenado por una variedad de señales extrínsecas e intrínsecas (2, 147). A diferencia de la necrosis, la apoptosis se considera un proceso activo de muerte que requiere la participación de la propia célula. Sólo aquellas células que contienen un programa intracelular específico para morir serán las que respondan al estímulo disparador. Se han identificado genes que pueden favorecer o evitar la apoptosis, actuando como reguladores del proceso (25, 140, 151). En toxicología la apoptosis también ha adquirido importancia, ya que se ha comprobado que la mayoría de las toxinas pueden inducirla (25). Con algunas toxinas se ha observado que el camino que conduce a la muerte celular dependería de la dosis tóxica. De este modo, muy altas dosis llevarían a la necrosis celular, mientras que dosis

menores darían lugar a la apoptosis (2, 25).

Si bien las células que sufren apoptosis adquieren una morfología característica detectable en los estudios ultraestructurales, es difícil reconocer y diferenciar la célula necrótica de la apoptótica con el microscopio óptico. (40, 165). El desarrollo de técnicas para la marcación de fragmentos de ADN en cortes parafinados ofrece nuevas posibilidades en la identificación de la célula apoptótica (34, 40, 165).

En el caso de los tricotecenos se ha utilizado el método TUNEL (TdT-mediated dUTP-nick end labeling) para la detección *in situ* de ADN fragmentado en cortes de tejidos afectados por estas micotoxinas. Diversos trabajos han demostrado que los mecanismos que conducen a la apoptosis juegan un papel importante en el desarrollo del daño celular ocasionado por los tricotecenos (70, 71, 72, 73, 117, 133).

## **H) Objetivos**

**\*General:** -Conocer los efectos de una dosis subletal de micotoxina T-2 en el ratón.

**\*Específicos:** -Conocer las alteraciones morfológicas celulares y subcelulares en diversos órganos.

-Evaluar las posibles variaciones en la presencia y localización de residuos hidrocarbonados del tracto gastrointestinal respecto al patrón normal.

-Detectar la micotoxina T-2 en cortes de tejidos.



## SECCION I

### ESTUDIOS HISTOPATOLOGICO Y ULTRAESTRUCTURAL

**\*Objetivo Especifico:** Conocer las alteraciones morfológicas celulares y subcelulares en diversos órganos.

#### **◆ MATERIALES Y METODOS**

**\*Animales:** se utilizaron 56 ratones ICR:CD-1, machos, libres de patógenos específicos (SPF), de 5 semanas de edad y peso variable entre 25 y 30 g (Charles River Japan, Kanagawa, Japón). Los mismos se alojaron en cajas metálicas convencionales bajo condiciones ambientales controladas (temperatura:  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; humedad:  $55 \pm 5 \%$ ). Se les suministró alimento comercial, libre de micotoxinas (Oriental Yeast Co. Ltd., Tokio, Japón) y agua *ad libitum* (excepto durante el período de ayuno).

**\*Micotoxina:** se utilizó micotoxina T-2 cristalina y cromatográficamente pura (Lote 117F4070, Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA). La toxina se disolvió en etanol y se diluyó en solución salina neutra de fosfato (PBS), previo a su administración, hasta obtener una concentración final de etanol al 20%.

**\*Diseño experimental:** los ratones se dividieron al azar en dos grupos: a) Grupo toxina-tratados (**Grupo T**) y b) Grupo control-no tratados (**Grupo C**), integrados por 28 ratones cada uno.

Previo a la administración de la toxina se sometió a los animales a un ayuno

de 14 hs.

Los ratones del **Grupo T** recibieron 10 mg de micotoxina T-2/Kg de peso vivo (PV), por intubación gástrica. A los animales del **Grupo C** se les administró una solución de etanol al 20 % en PBS.

(La elección de la dosis de micotoxina T-2 utilizada se realizó basándose en los datos obtenidos de una experiencia preliminar. En aquel caso se administraron distintas dosis de micotoxina T-2 a ratones bajo iguales condiciones experimentales. Las dosis variaron entre 0 y 12 mg de micotoxina T-2/Kg PV. Se seleccionó la dosis tóxica más alta que no produjo la muerte de ningún ratón).

Se sacrificaron 7 animales de cada grupo a las 8, 16, 24 y 48 horas posteriores a la administración (**HPA**) de la micotoxina T-2. El sacrificio se realizó mediante decapitación.

Se realizó la necropsia completa de todos los animales obteniéndose muestras de diversos órganos para el estudio posterior mediante microscopía óptica y electrónica y para la aplicación de técnicas de lectinhistoquímica e inmunohistoquímica.

-Peso corporal y de los órganos: de cada animal se registraron el peso corporal y el peso del hígado, timo y bazo.

\*Estudio histopatológico: de cada ratón, proveniente de ambos grupos experimentales (**Grupos T y C**), se extrajeron estómago, duodeno, íleon, ciego, colon, testículo, pulmón, hígado, riñón, corazón, páncreas, timo, bazo, linfonódulo mesentérico y médula ósea (fémur izquierdo). Los órganos se fijaron en una solución neutra de formaldehído al 10% y se procesaron según las técnicas histológicas de

rutina. Para la obtención de muestras de médula ósea se procedió a la descalcificación de las piezas óseas con una solución de citrato de sodio y ácido fórmico. Cortes de 4  $\mu\text{m}$  de espesor se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE). Como tinción complementaria se utilizó la técnica de ácido periódico Schiff (PAS) en los cortes de hígado (112).

**\*Estudio ultraestructural:** se obtuvieron muestras de hígado, timo y bazo de 2 ratones de cada grupo (**Grupos T y C**) a las **8, 16, 24 y 48 HPA**.

Las muestras se fijaron, a 4 °C durante 2 horas, en una solución de glutaraldehído al 2,5 % y paraformaldehído al 2 % en PBS 0,1 M (pH 7,4). Se realizó una posfijación en una solución de tetróxido de osmio al 1 % en el mismo buffer. La infiltración e imbibición de las muestras se realizó en resina epoxi (Quetol 812, Nisshin EM Co. Ltd., Tokio, Japón). Los cortes ultrafinos se tiñeron con acetato de uranilo/citrato de plomo y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión JEM-1200EX (JEOL Co. Ltd., Tokio, Japón).

**\*Análisis estadístico:**

**-Análisis del peso corporal y del peso de los órganos:** los datos del peso corporal y del peso de los órganos se analizaron mediante la prueba de Fisher (ANOVA) (138, 139). Se tuvieron en cuenta las diferencias entre los animales del **Grupo T** y los del **Grupo C** así como, dentro de cada grupo, las diferencias entre las distintas **HPA**.

**-Análisis de las lesiones microscópicas:** en varios de los órganos procesados, las lesiones observadas se agruparon en **clases** (conjunto de cambios cualitativos que conforman una unidad) y dentro de ellas se establecieron **grados de severidad** (transformación de hechos morfológicos en categorías numéricas de acuerdo a la intensidad de la lesión).

A partir del análisis estadístico de los números enteros indicadores de grado de severidad (grados 0 a 4) se obtuvieron valores intermedios (números decimales) que se expresaron como la **media** (valor promedio indicador de grado de lesión).

Sobre esta base, los cortes de **estómago** y de los distintos **segmentos intestinales (duodeno, íleon, colon y ciego)** se estudiaron mediante la observación de 4 campos microscópicos elegidos al azar (objetivo 40x). En cada campo se evaluó la presencia de las siguientes lesiones:

**-Estómago (región fúndica):**

a) Necrosis del epitelio de las unidades cimogénicas (grados 0 a 4)

    istmo

    cuello

    base

**-Intestino (duodeno, íleon, colon y ciego):**

a) Necrosis del epitelio de las criptas intestinales (grados 0 a 4).

b) Necrosis de los linfocitos de la lámina propia (grados 0 a 4).

c) Mitosis (número de mitosis por campo).

Los cortes de **hígado** se estudiaron mediante la observación de 4 campos microscópicos (objetivo 40x). En cada campo se evaluó la presencia de las siguientes

lesiones:

- a) Cariomegalia: cantidad de núcleos gigantes por campo.
- b) Necrosis celular individual: cantidad de hepatocitos necrosados por campo.
- c) Cuerpos acidófilos: cantidad de cuerpos acidófilos por campo.
- d) Glucógeno: células con gránulos de glucógeno en las zonas 1, 2 y 3 del acino hepático (cortes teñidos mediante la técnica de PAS), (grados 0 a 3).

Los cortes de páncreas se estudiaron mediante la observación de 5 campos microscópicos (objetivo 40x). En cada campo se evaluó la presencia de las siguientes lesiones:

- a) Necrosis de las células acinosas (grados 0 a 4).
- b) Gránulos de secreción: células acinosas con gránulos de cimógeno (grados 0 a 3).

Las muestras provenientes del timo, del bazo y del linfonódulo mesentérico se estudiaron mediante la observación completa de los cortes obtenidos. Se examinaron los cortes en tres oportunidades diferentes, evaluándose la presencia de las siguientes lesiones:

**-Timo:**

- a) Necrosis y disminución del número de los linfocitos de la corteza (grados 0 a 4).
- b) Necrosis y disminución del número de los linfocitos de la médula (grados 0 a 4).

**-Bazo:**

- a) Necrosis de los linfocitos de los nódulos esplénicos (pulpa blanca)  
(grados 0 a 4).
- b) Necrosis de los linfocitos de los cordones esplénicos (pulpa roja)  
(grados 0 a 4).

**-Linfonódulo mesentérico:**

- a) Necrosis y disminución del número de los linfocitos de la corteza  
(folículos primarios y corteza difusa) (grados 0 a 4).
- b) Necrosis y disminución del número de los linfocitos de la médula  
(grados 0 a 4).

La **necrosis celular**, observada en los distintos órganos, se graduó como sigue:

- \*grado 0: ausencia de células necróticas
- \*grado 1: escasas células necróticas
- \*grado 2: moderada cantidad de células necróticas
- \*grado 3: numerosas células necróticas
- \*grado 4: todas las células necróticas

La **disminución en el número de células linfoides** se graduó como sigue:

- \*grado 0: cantidad normal de linfocitos
- \*grado 1: escasa disminución de linfocitos
- \*grado 2: moderada disminución de linfocitos
- \*grado 3: marcada disminución de linfocitos
- \*grado 4: ausencia casi total de linfocitos

La **presencia de glucógeno** (hígado) y **gránulos de cimógeno** (páncreas) se graduó

como sigue:

\*grado 0: ausencia de células con gránulos

\*grado 1: escasa cantidad de células con gránulos

\*grado 2: moderada cantidad de células con gránulos

\*grado 3: numerosa cantidad de células con gránulos

Los valores obtenidos se analizaron, posteriormente, utilizando las pruebas Fisher (ANOVA) y Chi cuadrado (138, 139). Un valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo.

El resto de los órganos se estudió mediante la observación completa de los cortes.

## **◆ RESULTADOS**

### **\*Análisis del peso corporal y del peso de los órganos**

**-Peso corporal:** el peso corporal de los animales pertenecientes al **Grupo T** fue menor que el peso de los animales del **Grupo C**, en todos los tiempos del experimento. Esta diferencia en el peso corporal, entre ambos grupos, fue significativa a las **8, 24 y 48 HPA** ( $P < 0,05$ ) (Tabla 1).

Excepto a las **16 HPA**, momento en que el peso corporal fue significativamente mayor, no se observaron diferencias significativas entre las distintas HPA en los animales del **Grupo T**.

**-Hígado:** el peso relativo del hígado de los animales del **grupo T** fue significativamente menor que el peso registrado en los animales del **Grupo C**, en todos los tiempos del experimento ( $P < 0,05$ ) (Tabla 1).

En los animales del **Grupo T**, el menor peso relativo del hígado se observó a las

**8 HPA.** A las **16, 24 y 48 HPA** el peso fue aumentando con diferencias significativas entre todos los tiempos experimentales ( $P < 0,05$ ).

**-Timo:** el peso relativo del timo de los animales del **Grupo T** fue menor que el peso registrado en los animales del **Grupo C**, en todos los tiempos experimentales. Estas diferencias fueron significativas a las **16, 24 y 48 HPA** (Tabla 1).

A las **48 HPA**, el peso relativo del timo de los animales del **Grupo T** fue significativamente menor que el peso observado en el resto de los tiempos experimentales.

**-Bazo:** el peso relativo del bazo de los animales del **Grupo T** fue significativamente menor que el peso registrado en los animales del **Grupo C**, en todos los tiempos experimentales (Tabla 1).

No se observaron diferencias significativas entre las distintas HPA en los animales del **Grupo T**.

#### **\*Examen con microscopio óptico**

**-Estómago:** en los animales pertenecientes al **Grupo T** la lesión principal consistió en necrosis de las células epiteliales del istmo, cuello y base de las **unidades cimogénicas**. En cuatro animales, a las **24 y 48 HPA** se observó, además, necrosis y descamación del epitelio de revestimiento con hemorragias en la lámina propia.

En la región del **istmo**, el grado de necrosis celular (Tabla 2), a las **8 y 16 HPA** (0,70 y 0,75 respectivamente) fue significativamente mayor al grado registrado a las **24 HPA** (0,42). A las **48 HPA** el grado de necrosis celular (0,10) fue significativamente menor que el observado en el resto de los tiempos experimentales.



En la región del **cuello**, el grado de necrosis celular varió entre 0,11 y 0,18, no existiendo diferencias significativas entre las distintas **HPA**.

En la región de la **base**, el grado de necrosis a las **8 HPA** (0,21) fue significativamente menor que el observado en el resto de los tiempos experimentales. El mayor grado se registró a las **24 HPA** (1,06), con diferencias significativas respecto a lo observado a las **16 y 48 HPA** ( $P < 0,05$ ).

Las células del **istmo**, a las **8 HPA**, presentaron un grado de necrosis significativamente mayor respecto a lo observado en igual tiempo en las áreas del cuello y de la base ( $P < 0,05$ ).

A las **24 y 48 HPA** las células de la **base** evidenciaron un grado de necrosis significativamente mayor que el registrado en las áreas del cuello y del istmo, en los mismos tiempos experimentales ( $P < 0,05$ ).

En los animales pertenecientes al **Grupo C** no se observaron lesiones.

**-Intestino:** en los distintos segmentos intestinales estudiados (duodeno, íleon, ciego y colon) las lesiones observadas en los animales pertenecientes al **Grupo T** consistieron, principalmente, en la presencia de células necróticas en el epitelio de las criptas de Lieberkühn y en una variación en el número de mitosis observadas. Las células linfoides de la lámina propia se observaron con picnosis y cariorrexis. De igual modo, las placas de Peyer intestinales evidenciaron necrosis linfoides en la corteza y la médula. Sólo en algunos casos, a las **8 y 16 HPA**, se observaron degeneración, necrosis y descamación del epitelio de revestimiento de la mucosa con marcada dilatación del vaso quilífero central, edema, hiperemia y hemorragia en la lámina propia

de la mucosa y en la submucosa (Fig. 6 y 7).

El **grado de necrosis de las células de las criptas de Lieberkühn** (Tabla 3) en el duodeno, el íleon y el ciego, a las **8 y 16 HPA** fue significativamente mayor que el observado a las **24 y 48 HPA**. En el colon, el grado de necrosis hallado a las **16 HPA** fue significativamente mayor que en el resto de los tiempos experimentales ( $P < 0,05$ ).

El ciego presentó un grado significativamente menor de necrosis celular en todos los tiempos experimentales respecto al resto de los segmentos intestinales. El duodeno y el íleon fueron los tramos más afectados, principalmente a las **8 y 16 HPA** ( $P < 0,05$ ).

El **grado de necrosis de los linfocitos de la lámina propia** (Tabla 4), en el duodeno, fue de 0,96, 1 y 1,03 a las **8, 16 y 24 HPA** respectivamente, no existiendo diferencias significativas entre estos tiempos. A las **48 HPA**, el grado de necrosis linfocitaria fue significativamente menor ( $P < 0,05$ ). En el íleon, a las **8 HPA**, se observó un grado de necrosis (1,02) que resultó significativamente mayor a lo observado a las **16 HPA**. A las **24 y 48 HPA** el grado de linfocitos necróticos fue significativamente menor que en los períodos anteriores. En el ciego y en el colon, el grado de necrosis observado a las **16 HPA** fue significativamente mayor que el registrado en el resto de los tiempos experimentales.

El ciego y el colon presentaron un grado de necrosis linfocitaria significativamente menor en todos los tiempos experimentales, respecto al resto de los segmentos intestinales. El duodeno y el íleon fueron los tramos más afectados en todos los tiempos experimentales, principalmente el duodeno, el que, entre las **8 y 24 HPA**, evidenció una diferencia significativamente mayor en el grado de necrosis linfocitaria que a las **48 HPA** ( $P < 0,05$ ).

El **porcentaje de mitosis** (Tabla 5) en el duodeno, el íleon, el ciego y el colon, a las **8 y 16 HPA**, fue significativamente menor que el porcentaje observado a las **24 y 48 HPA** ( $P < 0,05$ ).

En general, en los animales del **Grupo T**, el porcentaje de mitosis en los distintos segmentos intestinales y en todos los tiempos experimentales, fue significativamente menor que el registrado en los animales del **Grupo C** (tablas 6 y 7).

En los animales pertenecientes al **Grupo C** no se observaron lesiones.

**-Hígado:** en los animales pertenecientes al **Grupo T**, se observaron hepatocitos con cambios de degeneración y necrosis celular. En general, muchas de las células presentaron cariomegalia, con marginación de la cromatina y plegamiento de la membrana nuclear. Algunas células, en forma aislada o en pequeños grupos, evidenciaron cambios necróticos consistentes en retracción celular, picnosis, cariorrexis, citoplasma homogéneo y fuertemente acidófilo y formación de cuerpos acidófilos.

Con la técnica de PAS se observó disminución o pérdida de los gránulos de glucógeno en el citoplasma (Fig. 8 a 14).

El **porcentaje de cuerpos acidofílicos** (Tabla 8) fue del 76% en las muestras obtenidas a las **8 HPA**, mientras que a las **16, 24 y 48 HPA** este porcentaje descendió significativamente.

El **porcentaje de cariomegalia** (Tabla 8), en las muestras obtenidas a las **8 HPA**, fue significativamente mayor que el observado a las **16, 24 y 48 HPA** ( $P < 0,05$ ).

El **porcentaje de necrosis celular individual** (Tabla 8), a las **8 HPA**, fue del

61%, disminuyendo significativamente a las **16 y 24 HPA** (24 y 15% respectivamente) hasta llegar al 0% a las **48 HPA** ( $P < 0,05$ ).

El **grado** indicativo de la cantidad de hepatocitos con **partículas de glucógeno** (Tabla 9) varió según el área del acino hepático considerada y el tiempo de observación.

A las **8 HPA** la ausencia de partículas de glucógeno fue total en las zonas 1, 2 y 3 en el **Grupo T**. A las **16 HPA** se observaron partículas de glucógeno en niveles significativamente inferiores a los del **Grupo C**, en las zonas 2 y 3. En igual tiempo, la ausencia de partículas fue total en la zona 1. A las **24 HPA** el grado de partículas alcanzó o superó los valores del **Grupo C** en las zonas 2 y 3. En igual tiempo, el grado de partículas fue significativamente menor a los valores control en la zona 1. A las **48 HPA** el grado de partículas de glucógeno en las zonas 1, 2 y 3 alcanzó o superó los valores del **Grupo C** (Tabla 9)

En los animales pertenecientes al **Grupo C** no se observaron lesiones.

**-Páncreas:** en los animales pertenecientes al **Grupo T**, las lesiones consistieron en necrosis aislada de las células acinosas y disminución en la cantidad de gránulos de zimógeno de las células acinosas. Las células necróticas se observaron retraídas y disociadas del resto de las células parenquimatosas, con citoplasma homogéneo y fuertemente acidófilo y núcleo con picnosis y cariorrexis. No se observó lesión en los islotes de Langerhans.

El **grado de necrosis celular** (Tabla 10), en los animales del **Grupo T**, fue significativamente alto a las **24 HPA**, en relación al resto de los tiempos

experimentales. No se observaron células necróticas en los animales del **Grupo C**.

El **grado** indicativo de la cantidad de células con **gránulos de cimógeno** (Tabla 10) en los animales del **Grupo T** fue significativamente menor que el registrado en el **Grupo C**, a las **8, 16 y 24 HPA** ( $P < 0,05$ ). Este valor presentó variaciones significativas en los distintos tiempos experimentales en los animales del **Grupo T**, manteniéndose constante en los del **Grupo C** ( $P < 0,05$ ).

**-Timo:** en los animales pertenecientes al **Grupo T**, los cambios observados consistieron, principalmente, en una marcada necrosis linfocitaria, caracterizada por picnosis y cariorrexis, comprometiendo tanto la corteza como la médula tímica. También fue evidente la disminución en el número de linfocitos corticales y medulares y, a partir de las **16 HPA**, se observó pérdida del límite córtico-medular y disminución en el espesor de la corteza (Fig. 14 a 18).

El **grado de disminución en el número de linfocitos** (Tabla 11) corticales fue aumentando en forma significativa en todos los tiempos experimentales, alcanzando su máximo a las **48 HPA**. En la médula tímica, el mayor descenso en el número de linfocitos se registró a las **24 HPA**, resultando significativamente diferente a los valores observados en el resto de los tiempos experimentales.

A las **8 y 16 HPA** la disminución del número de linfocitos fue significativamente mayor en la médula que en la corteza tímica. A las **24 HPA** el descenso fue mayor en la corteza que en la médula, sin diferencias significativas. Finalmente, a las **48 HPA** el grado de disminución en el número de linfocitos fue significativamente mayor en la corteza que el observado en la médula ( $P < 0,05$ ).

El **grado de necrosis celular** (Tabla 11) en la corteza y en la médula fue significativamente mayor, a las **16 y 24 HPA**, que el registrado a las 8 HPA. A las **48 HPA**, se observó un descenso significativo en el grado de necrosis. ( $P < 0,05$ ).

Durante todos los tiempos experimentales, el grado de necrosis celular fue más elevado en la corteza, existiendo una diferencia significativa entre los valores registrados en corteza y médula, a las **8 HPA** ( $P < 0,05$ ).

En los animales del **Grupo C** no se observaron lesiones.

**-Bazo:** en los animales pertenecientes al **Grupo T**, la lesión observada consistió en necrosis de los linfocitos de los nódulos esplénicos (pulpa blanca) y de los cordones esplénicos (pulpa roja).

El **grado de necrosis celular** (Tabla 12), tanto en la pulpa blanca como en la roja, fue alto a las **8 y 16 HPA**, con diferencias significativas respecto a lo registrado a las **24 y 48 HPA** ( $P < 0,05$ ).

A las **16 HPA**, la necrosis linfocitaria observada en los cordones esplénicos (pulpa roja) fue significativamente mayor que el grado consignado en la pulpa blanca ( $P < 0,05$ ).

El examen completo de los cortes de bazo (obj. 10x) de los animales del **Grupo T**, pareció evidenciar una disminución en la cantidad de células linfoides en la pulpa roja (no se evaluó estadísticamente). No se observó reducción en el número de células en los nódulos linfáticos (pulpa blanca).

En los animales del **Grupo C** no se observaron lesiones.

**-Linfonódulo mesentérico:** en los animales pertenecientes al **Grupo T**, los cambios observados consistieron en necrosis de los linfocitos de la corteza (folículos primarios y corteza difusa) y de la médula. Por otro lado, se observó una disminución en el número de linfocitos corticales y medulares (Fig. 19).

El **grado de disminución en el número de linfocitos** (Tabla 13) corticales y medulares fue máximo a las **16 HPA**. Los valores registrados a las **8 y 24 HPA** fueron significativamente menores. A las **48 HPA** se observó un grado elevado de disminución de la cantidad de linfocitos corticales y medulares. Este valor fue significativamente menor que el registrado a las **16 HPA**.

Durante todos los tiempos experimentales, el grado de disminución celular fue significativamente mayor en la corteza que en la médula ( $P < 0,05$ ).

El **grado de necrosis celular** (Tabla 13) en la corteza fue significativamente mayor, a las **8 y 16 HPA**, que el registrado a las **24 y 48 HPA**.

Durante todos los tiempos experimentales el grado de necrosis celular fue significativamente mayor en la corteza que en la médula ( $P < 0,05$ ).

Las Tablas 14 y 15 reflejan que el timo resultó el órgano linfático más severamente dañado.

En los animales del **Grupo C** no se observaron lesiones.

**-Médula ósea:** en los animales del **Grupo T** se observó regular cantidad de células de la serie linfocítica con cambios necróticos en todos los tiempos del experimento.

No se observó necrosis en las muestras de médula ósea provenientes de animales del **Grupo C**.

**-Pulmón, riñón, corazón y testículo:** no se observaron lesiones en ningún animal de los Grupos T y C. No se vieron afectadas las células del tejido linfóide asociado a los bronquios pulmonares (BALT).



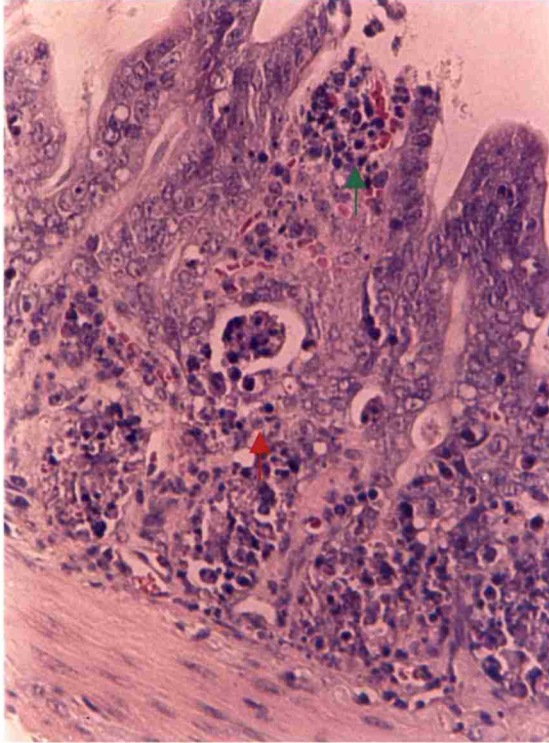
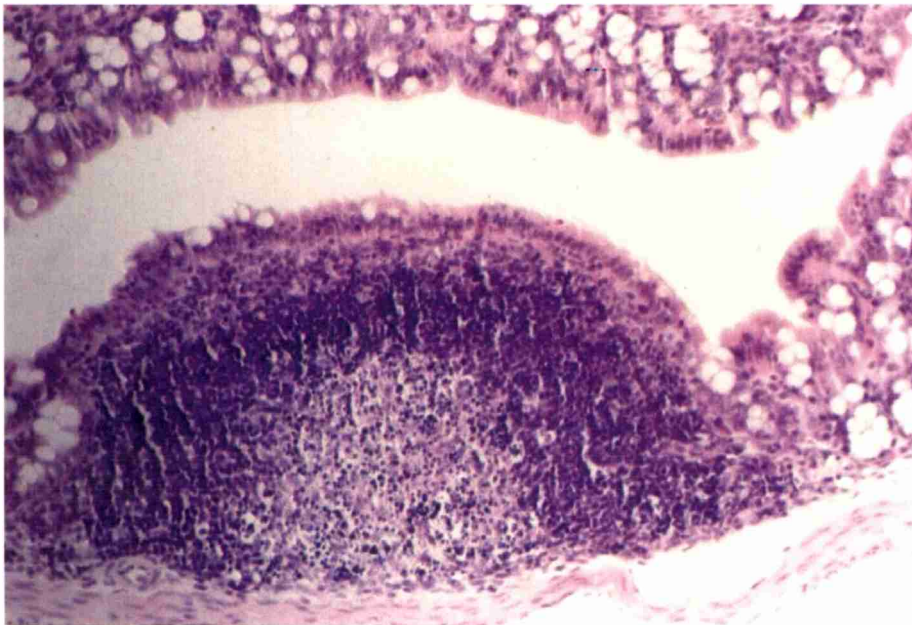
---

**\*Figura 6: Ileon de ratón tratado con micotoxina T-2, 16 HPA.**

Marcada necrosis de las células epiteliales de las criptas (→) y necrosis de los linfocitos de la lámina propia (▶). H y E, objetivo 20x.

**\*Figura 7: Colon de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Necrosis linfocitaria en una placa de Peyer. H y E, objetivo 20x.

**Figura 6****Figura 7**

---

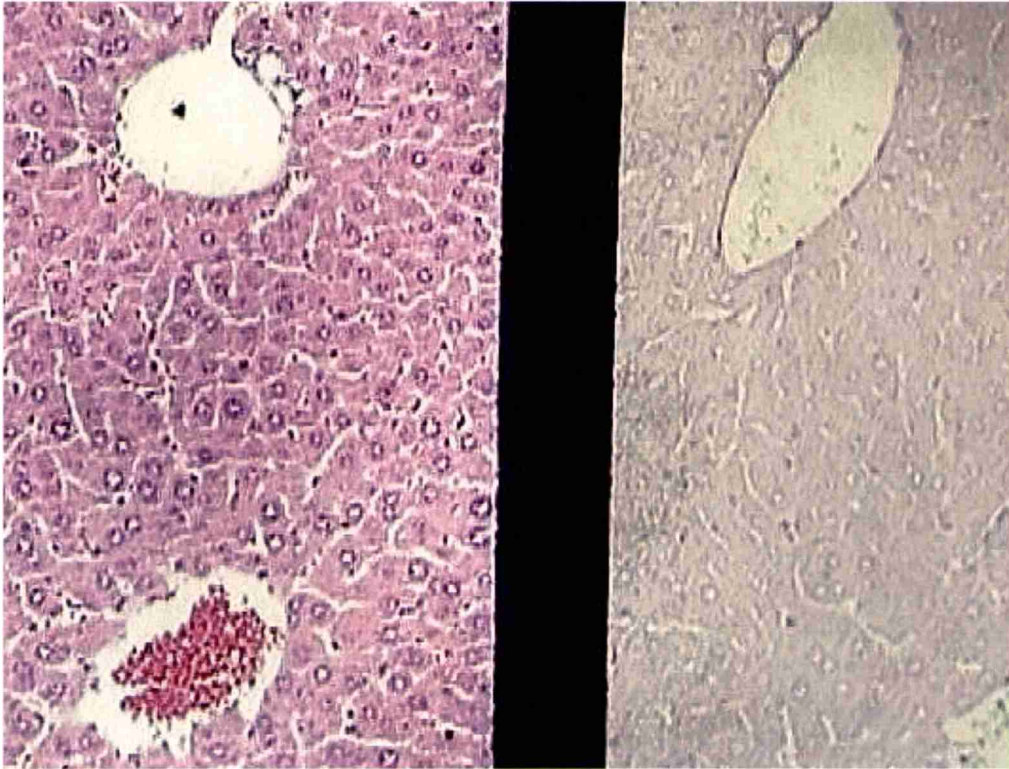
**\*Figura 8: Hígado de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

-Izquierda: aumento generalizado de la densidad y de la acidofilia citoplasmática. H y E, objetivo x20. -Derecha: pérdida completa de los gránulos de glucógeno citoplasmáticos. PAS, objetivo 20x.

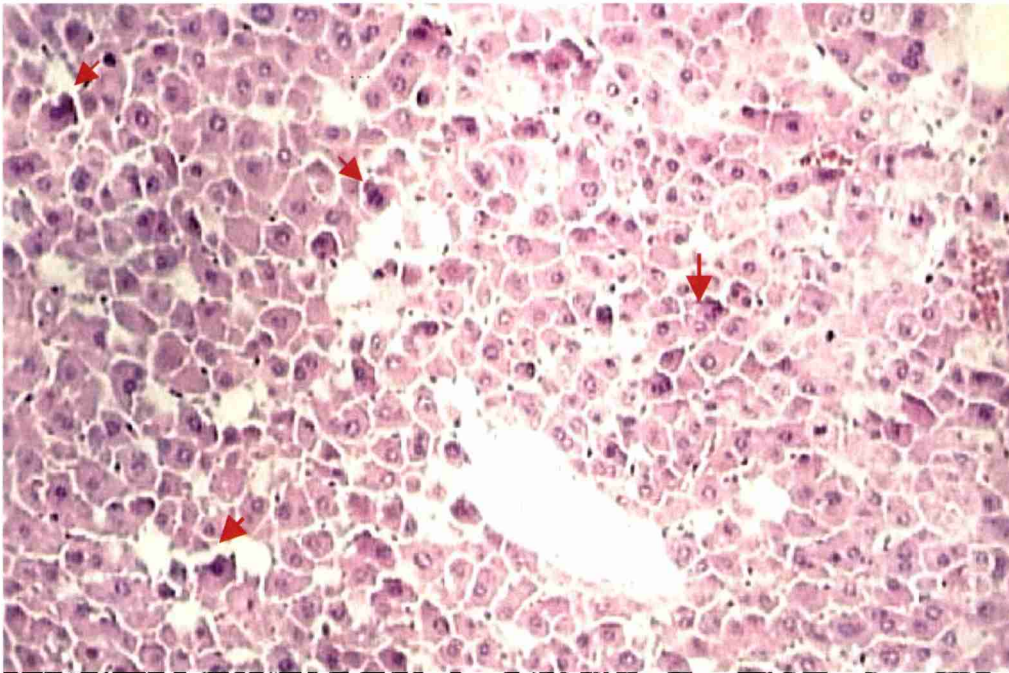
**\*Figura 9: Hígado de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Células hepáticas aisladas con necrosis coagulativa (→). H y E, objetivo x20.

**Figura 8**



**Figura 9**



---

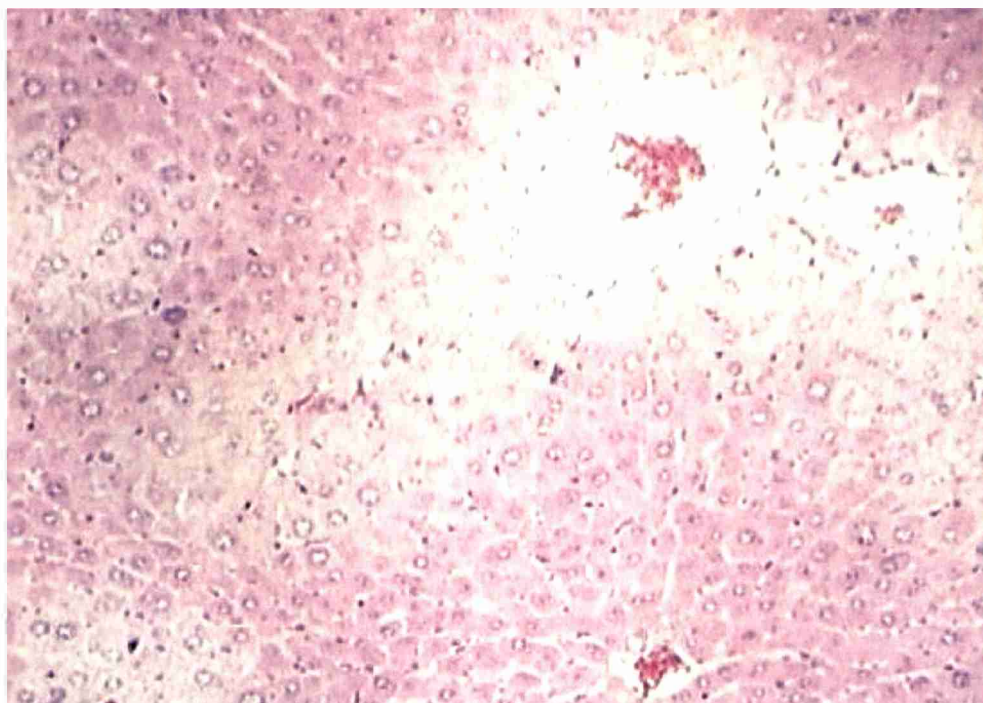
**\*Figura 10:** Hígado de ratón tratado con micotoxina T-2, 16 HPA.

Se observan algunos hepatocitos con cambios degenerativos. H y E, objetivo x20.

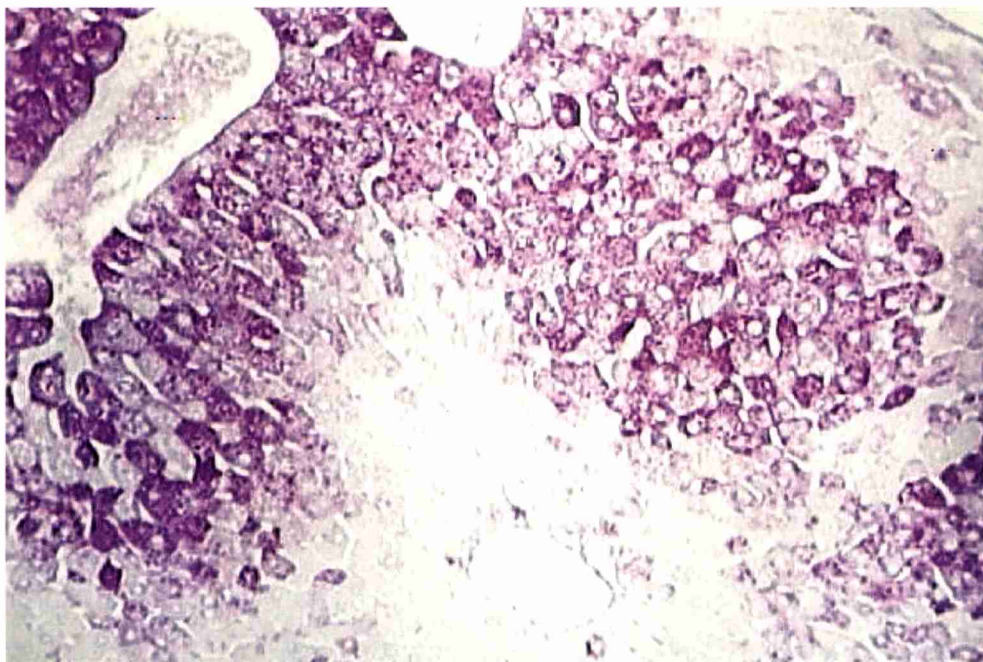
**\*Figura 11:** Hígado de ratón tratado con micotoxina T-2, 16 HPA.

Reaparición de gránulos de glucógeno en la zona 3 (centrolobulillar). PAS, objetivo 20x.

**Figura 10**



**Figura 11**



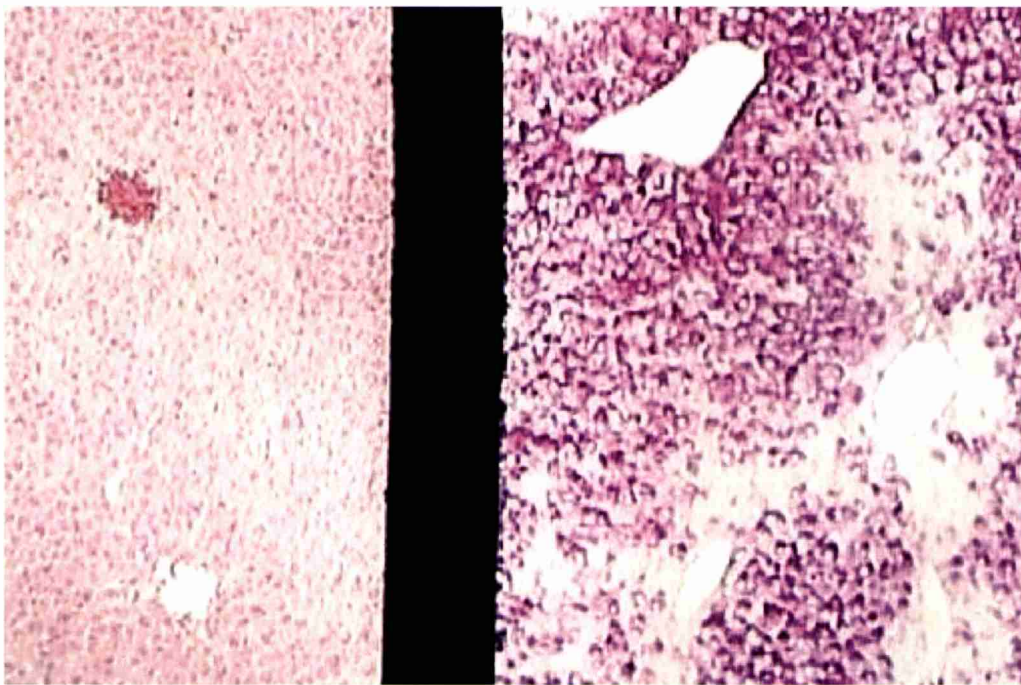
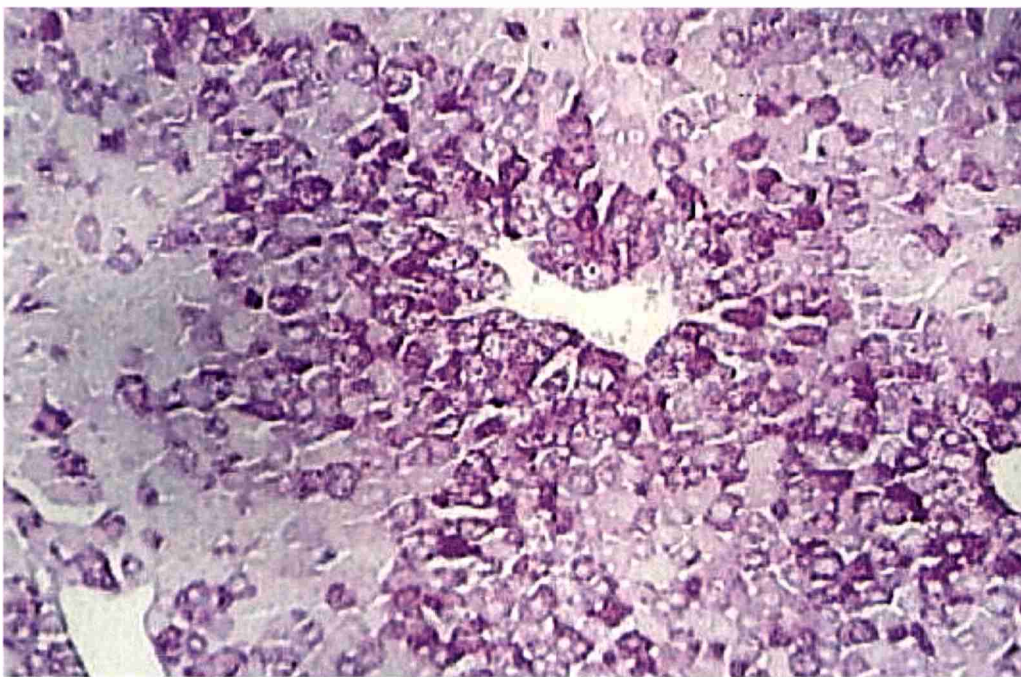
---

**\*Figura 12:** Hígado de ratón tratado con micotoxina T-2, 24 HPA.

-Izquierda: se observan algunos hepatocitos con cambios degenerativos en la zona 1 (perilobulillar). H y E, objetivo x20. –Derecha: reaparición de gránulos de glucógeno en las zonas 2 y 3 (mediozonal y centrolobulillar). PAS, objetivo 20x.

**\*Figura 13:** Hígado de ratón tratado con micotoxina T-2, 48 HPA.

Los gránulos de glucógeno están presentes en todas las células del lobulillo. PAS, objetivo 20x.

**Figura 12****Figura 13**



---

**\*Figura 14: Hígado de ratón del grupo control no tratado con micotoxina T-2.**

Los gránulos de glucógeno están distribuidos uniformemente en las células del lobulillo. PAS, objetivo 20x.

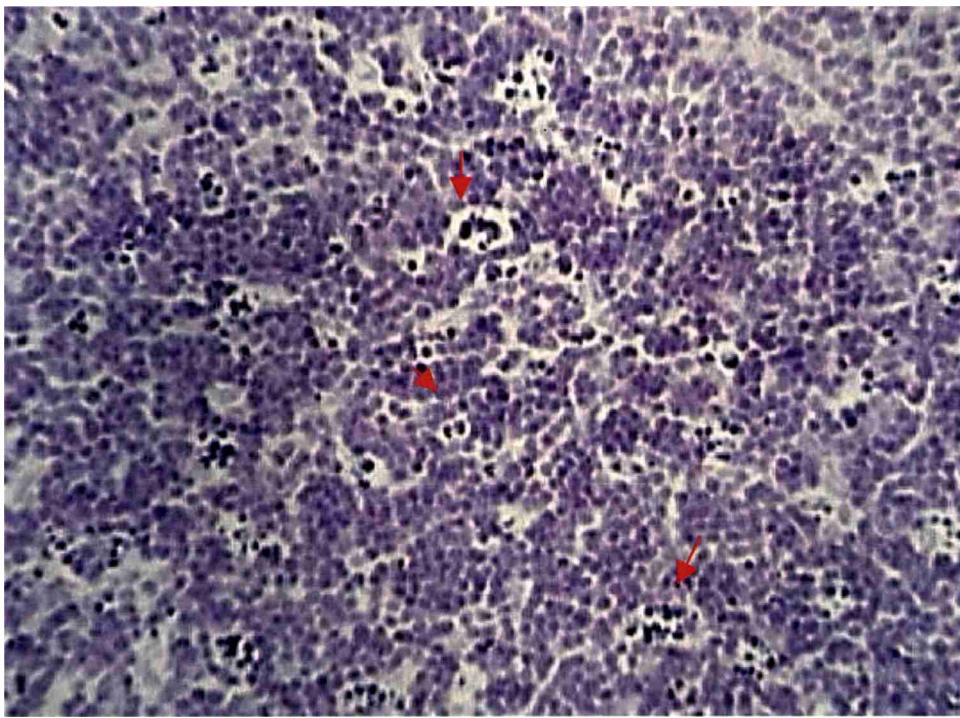
**\*Figura 15: Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, 24 HPA.**

Moderada necrosis linfocitaria en la corteza (→) y disminución del número de células. H y E, objetivo 40x.

**Figura 14**



**Figura 15**



---

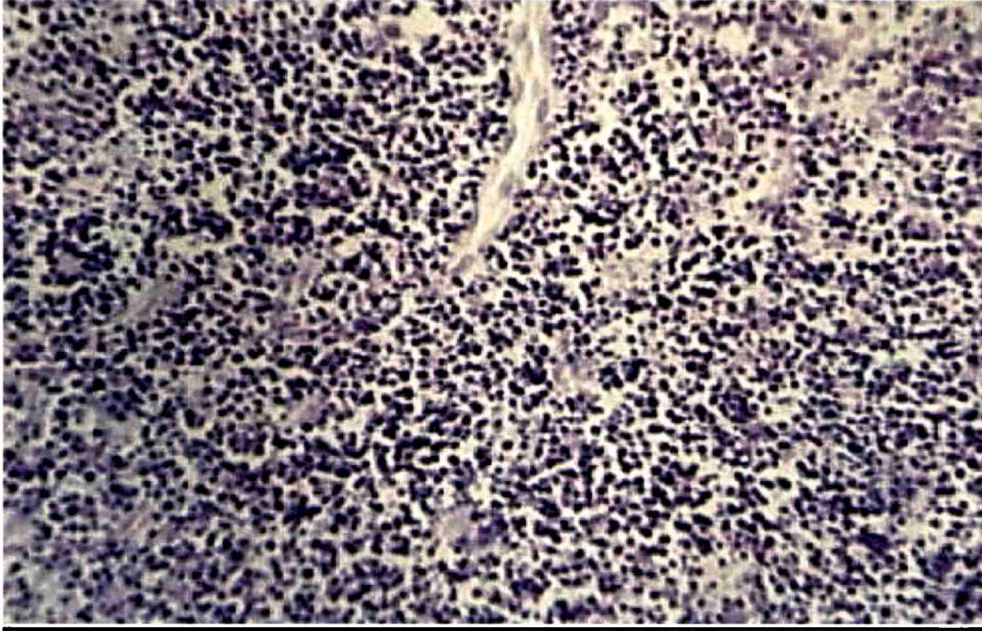
**\*Figura 16:** Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, 24 HPA.

Marcada necrosis linfocitaria en la corteza tímica. Evidente disminución del número de linfocitos corticales. H y E, objetivo 40x.

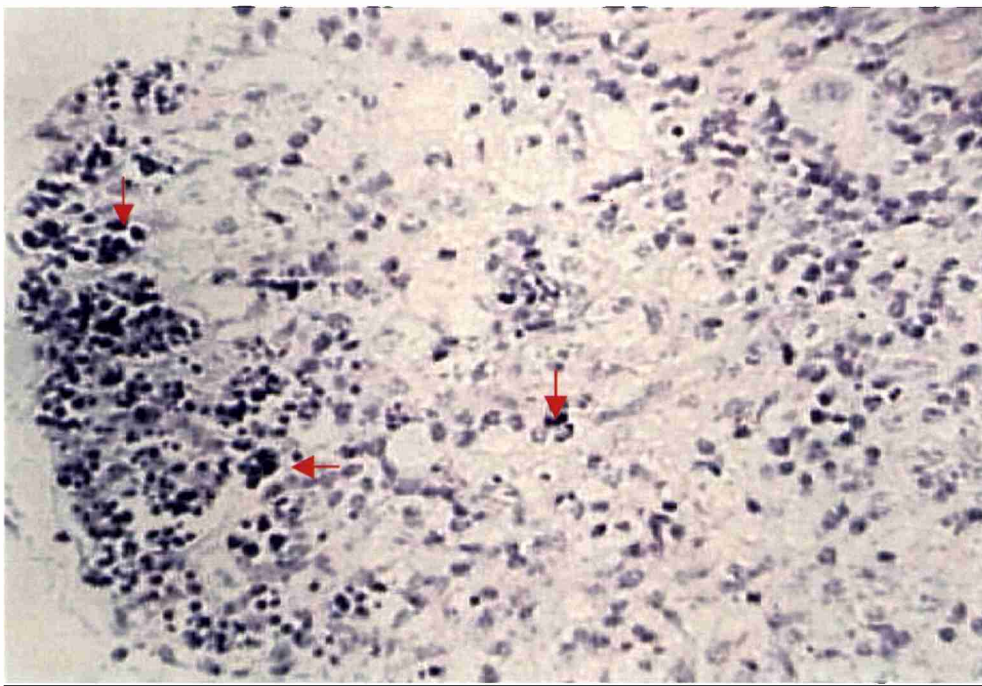
**\*Figura 17:** Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, 48 HPA.

Detalle de la necrosis (→). Ausencia de células linfocitarias. H y E, objetivo 40x.

**Figura 16**



**Figura 17**



---

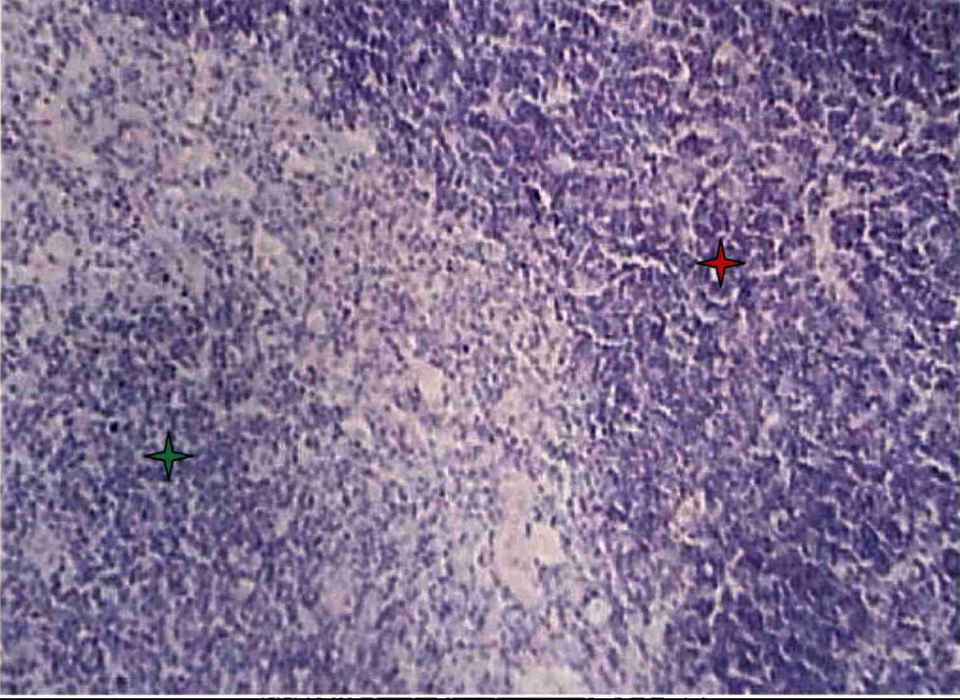
**\*Figura 18: Timo de ratón del grupo control no tratado con micotoxina T-2.**

Se distinguen claramente las zonas cortical (◆) y medular (◆), observándose la integridad de sus células. H y E, objetivo 20x.

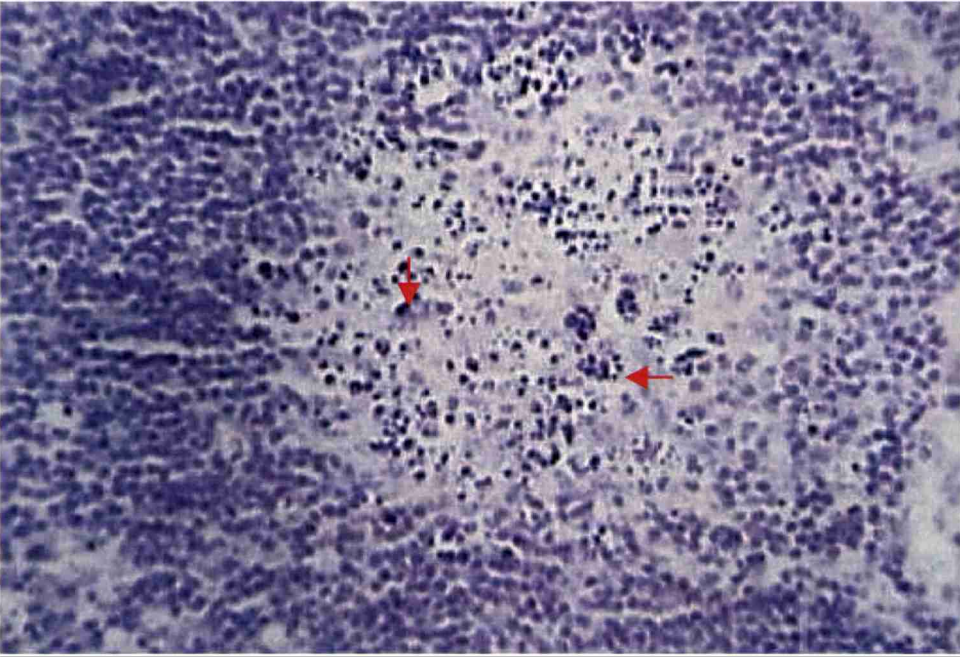
**\*Figura 19: Linfonódulo de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Necrosis linfocitaria en folículo linfoideo de la corteza (→) y disminución del número de linfocitos. H y E, objetivo 40x.

**Figura 18**



**Figura 19**



**TABLA 1 – Peso corporal y de los órganos de los ratones control y tratados con micotoxina T-2**

ANIMAL	HPA				ORGANOS
	8	16	24	48	
	Media (g)				
Grupo T	0,07 <sup>a,A</sup>	0,07 <sup>a,A</sup>	0,07 <sup>a,A</sup>	0,07 <sup>a,A</sup>	BAZO
Grupo C	0,08 <sup>b,A</sup>	0,09 <sup>b,A</sup>	0,09 <sup>b,A</sup>	0,12 <sup>b,B</sup>	
Grupo T	1,40 <sup>a,A</sup>	1,56 <sup>a,B</sup>	1,70 <sup>a,C</sup>	1,83 <sup>a,D</sup>	HIGADO
Grupo C	1,73 <sup>b,A</sup>	2,04 <sup>b,B</sup>	2,12 <sup>b,B</sup>	2,11 <sup>b,B</sup>	
Grupo T	0,05 <sup>a,A</sup>	0,06 <sup>a,B</sup>	0,05 <sup>a,A</sup>	0,03 <sup>a,C</sup>	TIMO
Grupo C	0,05 <sup>a,A</sup>	0,07 <sup>b,B</sup>	0,07 <sup>b,B</sup>	0,07 <sup>b,B</sup>	
Grupo T	28,04 <sup>a,A</sup>	29,42 <sup>a,B</sup>	28,53 <sup>a,A</sup>	28,69 <sup>a,A</sup>	PESO CORPORAL
Grupo C	29,44 <sup>b,A</sup>	29,86 <sup>a,A</sup>	31,12 <sup>b,B</sup>	32,62 <sup>b,C</sup>	

-Grupo T: animales tratados con micotoxina T-2.

-Grupo C: animales control-no tratados.

-HPA: horas posteriores a la administración.

-Media (g): valor promedio indicador del peso corporal y de los órganos, expresado en gramos.

-Significación vertical: las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a,b), son significativamente diferentes.

-Significación horizontal: las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C, D) son significativamente diferentes.

**TABLA 2 – Grado de necrosis celular en el estómago de ratones tratados con micotoxina T-2**

<b>ZONAS</b>	<b>HPA</b>			
	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
<b>Istmo</b>				
<b>Media</b>	0,70 <sup>a, A</sup>	0,75 <sup>a, A</sup>	0,42 <sup>a, B</sup>	0,10 <sup>a, C</sup>
<b>%h</b>	36%	38%	21%	5%
<b>%v</b>	64%	48%	26%	11%
<b>Cuello</b>				
<b>Media</b>	0,18 <sup>b, A</sup>	0,11 <sup>b, A</sup>	0,13 <sup>b, A</sup>	0,12 <sup>a, A</sup>
<b>%h</b>	33%	20%	25%	22%
<b>%v</b>	17%	7%	8%	14%
<b>Base</b>				
<b>Media</b>	0,21 <sup>b, A</sup>	0,69 <sup>a, B</sup>	1,06 <sup>c, C</sup>	0,66 <sup>b, B</sup>
<b>%h</b>	8%	26%	40%	25%
<b>%v</b>	19%	45%	66%	75%

-HPA: horas posteriores a la administración.

-Media: valor promedio indicador de grado de necrosis celular (grados 0 a 4).

-%h: porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

-%v: porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

-Significación vertical: las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b, c), son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

-Significación horizontal: las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).



**TABLA 3 – Grado de necrosis celular en las criptas intestinales de ratones tratados con micotoxina T-2**

<b>ZONAS</b>	<b>HPA</b>			
	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
<b><u>Duodeno</u></b>				
Media	1,34 <sup>a, A</sup>	1,19 <sup>a, A</sup>	0,71 <sup>a, B</sup>	0,47 <sup>a, C</sup>
%h	36%	32%	19%	13%
%v	34%	32%	31%	26%
<b><u>Ileon</u></b>				
Media	1,43 <sup>a, A</sup>	1,20 <sup>a, AB</sup>	0,98 <sup>b, B</sup>	0,46 <sup>a, C</sup>
%h	35%	30%	24%	11%
%v	37%	32%	42%	25%
<b><u>Ciego</u></b>				
Media	0,39 <sup>b, A</sup>	0,59 <sup>b, A</sup>	0,13 <sup>c, B</sup>	0,21 <sup>b, B</sup>
%h	31%	42%	10%	17%
%v	10%	14%	6%	12%
<b><u>Colon</u></b>				
Media	0,73 <sup>c, A</sup>	0,84 <sup>c, B</sup>	0,49 <sup>a, A</sup>	0,65 <sup>a, A</sup>
%h	27%	31%	18%	24%
%v	19%	22%	21%	36%

**-HPA:** horas posteriores a la administración.

**-Media:** valor promedio indicador de grado de necrosis celular (grados 0 a 4).

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b, c), son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**TABLA 4 – Grado de necrosis de linfocitos de la lámina propia intestinal en ratones tratados con micotoxina T-2**

<u>ZONAS</u>	<u>HPA</u>			
	8	16	24	48
<u>Duodeno</u>				
Media	0,96 <sup>a, A</sup>	1,00 <sup>a, A</sup>	1,03 <sup>a, A</sup>	0,49 <sup>a, B</sup>
%h	28%	29%	29%	14%
%v	43%	39%	66%	52%
<u>Ileon</u>				
Media	1,02 <sup>a, A</sup>	0,75 <sup>a, B</sup>	0,33 <sup>b, C</sup>	0,13 <sup>d, C</sup>
%h	46%	34%	14%	6%
%v	45%	29%	21%	14%
<u>Ciego</u>				
Media	0,13 <sup>b, A</sup>	0,44 <sup>b, B</sup>	0,10 <sup>c, A</sup>	0,21 <sup>b, A</sup>
%h	15%	50%	11%	24%
%v	6%	17%	6%	23%
<u>Colon</u>				
Media	0,13 <sup>b, A</sup>	0,37 <sup>b, B</sup>	0,10 <sup>c, A</sup>	0,10 <sup>b, A</sup>
%h	19%	53%	14%	14%
%v	6%	14%	6%	11%

**-HPA:** horas posteriores a la administración.

**-Media:** valor promedio indicador de grado de necrosis celular (grados 0 a 4).

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b, c), son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**TABLA 5 – Porcentaje de mitosis en intestino de ratones tratados con micotoxina T-2**

<u>ZONAS</u>	<u>HPA</u>			
	8	16	24	48
<b><u>Duodeno</u></b>				
Media	0,44 <sup>a, A</sup>	0,65 <sup>a, A</sup>	1,03 <sup>a, B</sup>	1,23 <sup>a, B</sup>
%h	13%	19%	31%	37%
%v	35%	37%	25%	32%
<b><u>Ileon</u></b>				
Media	0,21 <sup>a, A</sup>	0,36 <sup>b, A</sup>	0,78 <sup>b, B</sup>	0,93 <sup>b, B</sup>
%h	9%	16%	34%	41%
%v	17%	21%	19%	24%
<b><u>Ciego</u></b>				
Media	0,38 <sup>a, A</sup>	0,25 <sup>b, A</sup>	1,18 <sup>a, B</sup>	0,69 <sup>b, C</sup>
%h	15%	10%	48%	27%
%v	31%	14%	29%	18%
<b><u>Colon</u></b>				
Media	0,21 <sup>a, A</sup>	0,48 <sup>a, A</sup>	1,05 <sup>a, B</sup>	1,04 <sup>a, B</sup>
%h	8%	17%	38%	37%
%v	17%	28%	26%	27%

**-HPA:** horas posteriores a la administración.

**-Media:** valor promedio indicador de número de mitosis por campo.

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con células en mitosis en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con células en mitosis en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b, c), son significativamente diferentes (P< 0,05).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes (P< 0,05).

**TABLA 6 – Porcentaje de mitosis en intestino de ratones control y tratados con micotoxina T-2**

ANIMAL	HPA				ZONAS
	8	16	24	48	
<b>Grupo T</b>					<b>Duodeno</b>
Media	0,44 <sup>a, A</sup>	0,65 <sup>a, A</sup>	1,03 <sup>a, B</sup>	1,23 <sup>a, B</sup>	
%h	13%	19%	31%	37%	
%v	22%	27%	56%	47%	
<b>Grupo C</b>					
Media	1,53 <sup>b, A</sup>	1,74 <sup>b, B</sup>	0,82 <sup>b, C</sup>	1,41 <sup>b, D</sup>	
%h	28%	32%	15%	25%	
%v	78%	73%	44%	53%	
<b>Grupo T</b>					<b>Ileon</b>
Media	0,21 <sup>a, A</sup>	0,36 <sup>a, A</sup>	0,78 <sup>a, A</sup>	0,93 <sup>a, A</sup>	
%h	9%	16%	34%	41%	
%v	30%	29%	42%	44%	
<b>Grupo C</b>					
Media	0,49 <sup>b, A</sup>	0,90 <sup>b, B</sup>	1,06 <sup>b, C</sup>	1,19 <sup>b, D</sup>	
%h	13%	25%	29%	33%	
%v	70%	71%	58%	56%	

-**Grupo T:** animales tratados con micotoxina T-2.

-**Grupo C:** animales control-no tratados.

-**HPA:** horas posteriores a la administración.

-**Media:** valor promedio indicador de número de mitosis por campo.

-**%h:** porcentaje de campos microscópicos con células en mitosis en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

-**%v:** porcentaje de campos microscópicos con células en mitosis en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

-**Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

-**Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C, D) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**TABLA 7 – Porcentaje de mitosis en intestino de ratones control y tratados con micotoxina T-2**

<u>ANIMAL</u>	<u>HPA</u>				<u>ZONAS</u>
	8	16	24	48	
<u>Grupo T</u>					<u>Ciego</u>
Media	0,38 <sup>a, A</sup>	0,25 <sup>a, B</sup>	1,18 <sup>a, A</sup>	0,68 <sup>a, C</sup>	
%h	15%	10%	48%	27%	
%v	51%	18%	58%	39%	
<u>Grupo C</u>					
Media	0,37 <sup>a, A</sup>	1,15 <sup>a, B</sup>	0,85 <sup>b, C</sup>	1,07 <sup>b, D</sup>	
%h	11%	33%	25%	31%	
%v	49%	82%	42%	61%	
<u>Grupo T</u>					<u>Colon</u>
Media	0,21 <sup>a, A</sup>	0,48 <sup>a, A</sup>	1,05 <sup>a, B</sup>	1,04 <sup>a, B</sup>	
%h	8%	17%	38%	37%	
%v	25%	34%	39%	41%	
<u>Grupo C</u>					
Media	0,63 <sup>b, A</sup>	0,91 <sup>b, B</sup>	1,67 <sup>b, C</sup>	1,51 <sup>b, D</sup>	
%h	14%	19%	35%	32%	
%v	75%	66%	61%	59%	

-**Grupo T:** animales tratados con micotoxina T-2.

-**Grupo C:** animales control-no tratados.

-**HPA:** horas posteriores a la administración.

-**Media:** valor promedio indicador de número de mitosis por campo.

-**%h:** porcentaje de campos microscópicos con células en mitosis en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

-**%v:** porcentaje de campos microscópicos con células en mitosis en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

-**Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

-**Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C, D) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**TABLA 8 – Lesiones en hígado de ratones tratados con micotoxina T-2**

LESION	HPA			
	8	16	24	48
<b>CA</b>				
Media	0,70 <sup>A</sup>	0,07 <sup>B</sup>	0,16 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>
%h	76%	7%	17%	0%
%v	11%	2%	6%	0%
<b>CM</b>				
Media	4,60 <sup>A</sup>	2,50 <sup>B</sup>	2,40 <sup>B</sup>	2,07 <sup>B</sup>
%h	40%	21%	21%	18%
%v	72%	83%	85%	100%
<b>NI</b>				
Media	1,10 <sup>A</sup>	0,43 <sup>B</sup>	0,28 <sup>B</sup>	0 <sup>C</sup>
%h	61%	24%	15%	0%
%v	17%	14%	10%	0%

**-HPA:** horas posteriores a la administración

**-CA:** cuerpos acidofílicos.

**-CM:** cariomegalia.

**-NI:** necrosis celular individual.

**-Media:** valor promedio indicador de número de CA, CM y NI por campo.

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con CA, CM y NI en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con CA, CM y NI en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**TABLA 9 – Grado indicativo de la cantidad de hepatocitos con gránulos de glucógeno en los ratones control y tratados con micotoxina T-2**

<u>ANIMAL</u>	<u>HPA</u>				<u>HIGADO</u>
	8	16	24	48	
<u>Grupo T</u>					<u>Zona 1</u>
Media	0 <sup>a, A</sup>	0 <sup>a, A</sup>	0,66 <sup>a, B</sup>	0,43 <sup>a, C</sup>	(periportal)
%h	0%	0%	61%	39%	
%v	0%	0%	34%	68%	
<u>Grupo C</u>					
Media	2 <sup>b, A</sup>	1,60 <sup>b, B</sup>	1,25 <sup>b, C</sup>	0,20 <sup>b, D</sup>	
%h	39%	32%	25%	4%	
%v	100%	100%	66%	32%	
<u>Grupo T</u>					<u>Zona 2</u>
Media	0 <sup>a, A</sup>	0,43 <sup>a, B</sup>	1,57 <sup>a, C</sup>	1,34 <sup>a, C</sup>	(mediozonal)
%h	0%	13%	47%	40%	
%v	0%	21%	56%	45%	
<u>Grupo C</u>					
Media	2,00 <sup>b, A</sup>	1,60 <sup>b, B</sup>	1,25 <sup>a, C</sup>	1,64 <sup>a, B</sup>	
%h	31%	25%	19%	25%	
%v	100%	79%	44%	55%	
<u>Grupo T</u>					<u>Zona 3</u>
Media	0 <sup>a, A</sup>	0,43 <sup>a, B</sup>	1,83 <sup>a, C</sup>	1,49 <sup>a, D</sup>	(centrolobulillar)
%h	0%	11%	49%	40%	
%v	0%	21%	59%	54%	
<u>Grupo C</u>					
Media	2,20 <sup>b, A</sup>	1,60 <sup>b, B</sup>	1,25 <sup>b, C</sup>	1,28 <sup>a, C</sup>	
%h	35%	25%	20%	20%	
%v	0%	21%	59%	54%	

-**Grupo T:** animales tratados con micotoxina T-2.

-**Grupo C:** animales control-no tratados.

-**HPA:** horas posteriores a la administración

-**Media:** valor promedio indicador de grado de hepatocitos con gránulos de glucógeno por campo (grados 0 a 3).

-**%h:** porcentaje de campos microscópicos con células con gránulos de glucógeno (grados 0 a 3) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

-**%v:** porcentaje de campos microscópicos con células con gránulos de glucógeno (grados 0 a 3) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

-**Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes (P < 0,05).

-**Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C, D) son significativamente diferentes (P < 0,05).

**TABLA 10 – Grado de lesión en páncreas de ratones control y tratados con micotoxina T-2**

<u>ANIMAL</u>	<u>HPA</u>				<u>HIGADO</u>
	8	16	24	48	
<u>Grupo T</u>					<u>Necrosis individual</u>
Media	0,30 <sup>a, A</sup>	0,20 <sup>a, A</sup>	0,70 <sup>a, B</sup>	0,10 <sup>a, A</sup>	
%h	23%	15%	54%	8%	
%v	100%	100%	100%	100%	
<u>Grupo C</u>					
Media	0 <sup>b, A</sup>	0 <sup>b, A</sup>	0 <sup>b, A</sup>	0 <sup>b, A</sup>	
%h	0%	0%	0%	0%	
%v	0%	0%	0%	0%	
<u>Grupo T</u>					
Media	0,97 <sup>a, A</sup>	2,37 <sup>a, B</sup>	1,76 <sup>a, C</sup>	3 <sup>a, D</sup>	<u>Gránulos</u>
%h	12%	29%	22%	37%	
%v	24%	44%	37%	50%	
<u>Grupo C</u>					
Media	3 <sup>b, A</sup>	3 <sup>b, A</sup>	3 <sup>b, A</sup>	3 <sup>a, A</sup>	
%h	25%	25%	25%	25%	
%v	76%	56%	63%	50%	

**-Grupo T:** animales tratados con micotoxina T-2.

**-Grupo C:** animales control-no tratados.

**-HPA:** horas posteriores a la administración.

**-Media:** valor promedio indicador de grado de necrosis celular (grados 0 a 4) o de grado de células con gránulos de cimógeno (grados 0 a 3) por campo.

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) o con células con gránulos de cimógeno (grados 0 a 3) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) o con células con gránulos de cimógeno (grados 0 a 3) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes (P < 0,05).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C, D) son significativamente diferentes (P < 0,05).



**TABLA 11 – Grados de disminución y de necrosis linfocitaria en timo de ratones tratados con micotoxina T-2**

<u>LESION</u>	<u>HPA</u>				<u>ZONA</u>
	8	16	24	48	
<u>DL</u>					<u>Corteza</u>
Media	0,60 <sup>a, A</sup>	1,06 <sup>a, B</sup>	2,20 <sup>a, C</sup>	3,57 <sup>a, D</sup>	
%h	8%	14%	30%	48%	
%v	30%	43%	52%	74%	
<u>DL</u>					<u>Médula</u>
Media	1,40 <sup>b, A</sup>	1,39 <sup>b, A</sup>	2 <sup>a, B</sup>	1,29 <sup>b, A</sup>	
%h	23%	23%	33%	21%	
%v	70%	57%	53%	74%	
<u>NL</u>					<u>Corteza</u>
Media	2 <sup>a, A</sup>	3,72 <sup>a, B</sup>	3,80 <sup>a, B</sup>	3,38 <sup>a, C</sup>	
%h	16%	29%	29%	26%	
%v	65%	71%	69%	77%	
<u>NL</u>					<u>Médula</u>
Media	1,07 <sup>b, A</sup>	1,50 <sup>a, B</sup>	1,73 <sup>a, B</sup>	1 <sup>a, A</sup>	
%h	20%	28%	29%	26%	
%v	35%	29%	31%	23%	

**-HPA:** horas posteriores a la administración.

**-DL:** disminución en la cantidad de linfocitos. ...

**-NL:** necrosis de linfocitos.

**-Media:** valor promedio indicador de grados de DL o NL (grados 0 a 4).

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con NL o DL (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con NL o DL (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes (P< 0,05).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C, D) son significativamente diferentes (P< 0,05).

**TABLA 12 – Grado de necrosis linfocitaria en bazo de ratones tratados con micotoxina T-2**

ZONA	HPA			
	8	16	24	48
<b>PB</b>				
Media	0,94 <sup>a, A</sup>	0,67 <sup>a, B</sup>	0,14 <sup>a, C</sup>	0,24 <sup>a, C</sup>
%h	48%	34%	7%	12%
%v	48%	40%	50%	63%
<b>PR</b>				
Media	1 <sup>a, A</sup>	1 <sup>b, A</sup>	0,14 <sup>a, B</sup>	0,14 <sup>a, B</sup>
%h	44%	44%	6%	6%
%v	52%	60%	50%	37%

**-HPA:** horas posteriores a la administración

**-PB:** pulpa blanca.

**-PR:** pulpa roja.

**-Media:** valor promedio indicador de grado de necrosis celular (grados 0 a 4).

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**TABLA 13– Grados de disminución y de necrosis linfocitaria en linfonódulos de ratones tratados con micotoxina T-2**

<u>LESION</u>	<u>HPA</u>				<u>ZONA</u>
	8	16	24	48	
<u>DL</u>					<u>Corteza</u>
Media	0,94 <sup>a, A</sup>	2,19 <sup>a, B</sup>	0,72 <sup>a, A</sup>	1,24 <sup>a, C</sup>	
%h	19%	43%	14%	24%	
%v	100%	66%	81%	64%	
<u>DL</u>					<u>Médula</u>
Media	0 <sup>b, A</sup>	1,14 <sup>b, B</sup>	0,17 <sup>b, A</sup>	0,71 <sup>b, C</sup>	
%h	0%	57%	8%	35%	
%v	0%	34%	19%	36%	
<u>NL</u>					<u>Corteza</u>
Media	1,17 <sup>a, A</sup>	1,29 <sup>a, A</sup>	0,83 <sup>a, B</sup>	1,05 <sup>a, B</sup>	
%h	27%	30%	19%	24%	
%v	87%	65%	83%	65%	
<u>NL</u>					<u>Médula</u>
Media	0,17 <sup>b, A</sup>	0,71 <sup>b, B</sup>	0,17 <sup>b, A</sup>	0,57 <sup>b, B</sup>	
%h	10%	44%	10%	36%	
%v	13%	35%	17%	35%	

**-HPA:** horas posteriores a la administración.

**-DL:** disminución en la cantidad de linfocitos.

**-NL:** necrosis de linfocitos.

**-Media:** valor promedio indicador de grados de DL o NL (grados 0 a 4).

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con NL o DL (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con NL o DL (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes (P< 0,05).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes (P< 0,05).

**TABLA 14 – Grado de necrosis linfocitaria en órganos linfoides de ratones tratados con micotoxina T-2**

<b>ORGANO</b>	<b>HPA</b>			
	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>24</b>	<b>48</b>
<i>Bazo</i>				
<b>Media</b>	0,97 <sup>a, A</sup>	0,83 <sup>a, A</sup>	0,14 <sup>a, B</sup>	0,19 <sup>a, B</sup>
%h	45%	39%	7%	9%
%v	31%	19%	4%	6%
<b>Linfonódulo</b>				
<b>Media</b>	0,67 <sup>b, A</sup>	1 <sup>a, B</sup>	0,59 <sup>a, A</sup>	0,81 <sup>a, B</sup>
%h	22%	34%	17%	27%
%v	21%	22%	15%	25%
<b>Timo</b>				
<b>Media</b>	1,53 <sup>c, A</sup>	2,61 <sup>b, B</sup>	2,77 <sup>b, B</sup>	2,19 <sup>b, B</sup>
%h	17%	29%	30%	24%
%v	48%	59%	81%	69%

**-HPA:** horas posteriores a la administración.

**-Media:** valor promedio indicador de grado de necrosis celular (grados 0 a 4).

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con necrosis celular (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b, c), son significativamente diferentes (P < 0,05).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B) son significativamente diferentes (P < 0,05).

**TABLA 15 – Grado de disminución linfocitaria en órganos linfoides de ratones tratados con micotoxina T-2**

ORGANO	HPA			
	8	16	24	48
<b>Linfonódulo</b>				
Media	0,47 <sup>a, A</sup>	1,67 <sup>a, B</sup>	0,44 <sup>a, A</sup>	0,98 <sup>a, C</sup>
%h	13%	47%	12%	28%
%v	32%	58%	17%	29%
<b>Timo</b>				
Media	1 <sup>b, A</sup>	1,22 <sup>b, A</sup>	2,10 <sup>b, B</sup>	2,43 <sup>b, B</sup>
%h	15%	18%	31%	36%
%v	68%	42%	83%	71%

**-HPA:** horas posteriores a la administración

**-Media:** valor promedio indicador de grado de disminución linfocitaria (grados 0 a 4).

**-%h:** porcentaje de campos microscópicos con disminución linfocitaria (grados 0 a 4) en las distintas HPA (lectura horizontal de la tabla).

**-%v:** porcentaje de campos microscópicos con disminución linfocitaria (grados 0 a 4) en las distintas zonas (lectura vertical de la tabla).

**-Significación vertical:** las medias dentro de la misma columna, y con distintos supraíndices (a, b), son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

**-Significación horizontal:** las medias dentro de la misma línea, y con distintos supraíndices (A, B, C) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).

### **\*Examen con microscopio electrónico**

**-Hígado:** a las 8 HPA, los hepatocitos de las muestras provenientes del **Grupo T** presentaron lesiones ultraestructurales en el núcleo y en diversas organelas citoplásmicas.

En algunos hepatocitos se observó picnosis caracterizada por una marcada retracción nuclear, con plegamiento de la membrana, prominencia de los poros nucleares y condensación de la cromatina. Acompañando estos cambios, se observó marginación de la cromatina a lo largo de la superficie interna de la membrana nuclear con ausencia de cromatina en otras áreas de la matriz nuclear (Fig. 20).

Las mitocondrias se observaron agrupadas, principalmente en disposición perinuclear. Numerosas mitocondrias presentaron formas anulares y de copa. Las mitocondrias en forma de anillo evidenciaron, en su espacio central, matriz citoplásmica, fracciones de retículo endoplásmico rugoso (RER) y de retículo endoplásmico liso (REL) y algunos ribosomas libres (Fig. 20). Algunas de las mitocondrias deformadas presentaron crestas orientadas longitudinalmente, paralelas al eje mayor, con persistencia de crestas que conservaron la dirección perpendicular. En general, las mitocondrias evidenciaron una matriz electrodensa homogénea con ausencia de gránulos densos. En algunos casos se observaron focos electrolúcidos en la matriz mitocondrial (Fig. 20 y 21).

El RER presentó una distribución irregular en toda la matriz citoplásmica (Fig. 22). En algunas áreas las cisternas del RER se observaron con una disposición laminar mientras que, en otras, algunas fracciones del RER evidenciaron formas tortuosas rodeando otras organelas membranosas (Fig. 20). En numerosos hepatocitos se

observaron dilatación y vesiculización del RER (Fig. 21). La degranulación del RER acompañó a la vesiculización, caracterizándose por los escasos ribosomas que tapizaron las membranas del RER y por la presencia de gran cantidad de ribosomas libres en el citoplasma. Se constató la pérdida de la configuración en roseta y en espiral de los polirribosomas, con una manifiesta disgregación ribosomal (Fig. 23).

En la mayoría de las células se observaron hipertrofia y proliferación del REL (Fig. 20 y 21), así como dilatación de las cisternas del aparato de Golgi y pérdida de las grandes vesículas secretorias (Fig. 21 y 22). En algunos casos se constató la presencia de figuras de mielina (Fig. 22).

En esta etapa, no se observaron partículas de glucógeno.

A las **16 HPA** los hepatocitos del **Grupo T** presentaron las mismas lesiones ultraestructurales descritas en las muestras correspondientes a las **8 HPA**.

Los canalículos biliares se observaron dilatados, comprobándose una reducción y deformación de las microvellosidades de la superficie secretoria del hepatocito (Fig. 24).

En algunos casos se observaron hepatocitos con cambios necróticos que se caracterizaron por la presencia de vacuolas autofágicas y por la pérdida de la estructura citoplasmática (Fig. 25).

A las **24 HPA** las lesiones descritas a las 8 y 16 HPA persistieron sólo en los hepatocitos periportales del **Grupo T**. En esta etapa reaparecieron las partículas de glucógeno y el RER presentó una distribución principalmente perinuclear y en forma de cisternas superpuestas (Fig. 26).

A las **48 HPA** los hepatocitos del **Grupo T** presentaron una imagen cercana a la

normal, con características similares a los hepatocitos del **Grupo C**.

**-Timo:** a las **8 HPA** las lesiones ultraestructurales observadas en las muestras pertenecientes al **Grupo T** comprometieron, principalmente, a los linfocitos de la corteza tímica. Numerosas células evidenciaron núcleos con cambios de picnosis, cariorrexis y cariólisis. Fueron características la condensación, fragmentación y disolución de los núcleos, observándose núcleos donde la cromatina condensada se dispuso en forma de medialuna. En algunos casos se observaron cuerpos apoptóticos que consistieron en fragmentos citoplasmáticos ovoides o esféricos conteniendo remanentes de organelas citoplasmáticas o de material nuclear picnótico (Fig. 27).

A las **16 HPA** los núcleos de los linfocitos tímicos corticales presentaron las alteraciones ya descritas a las 8 HPA. En algunos casos se observaron proyecciones pedunculadas y fragmentos de material nuclear, rodeados de membrana, parcial o totalmente separados de la masa nuclear principal por una banda de matriz citoplásmica (Fig. 28, 29). Algunos núcleos presentaron profundas invaginaciones de la membrana nuclear conteniendo material citoplásmico. En unos pocos casos, estas invaginaciones llegaron a escindir el núcleo en dos porciones completamente separadas (Fig. 30). En la médula del timo, algunas células retículoepiteliales presentaron formaciones similares a canalículos intracitoplásmicos. Estas estructuras consistieron en espacios quísticos limitados por una membrana desde la cual se proyectaron escasas microvellosidades (Fig. 31). En general, las células retículoepiteliales corticales y medulares presentaron gruesas bandas de tonofilamentos intracitoplásmicos.

A la **24 HPA** las lesiones observadas fueron similares a las descritas a las **16**



**HPA.**

A las **48 HPA** las características de los linfocitos tímicos del **Grupo T** fueron similares a los del **Grupo C** (Fig. 32).

**-Bazo:** las lesiones ultraestructurales observadas en las muestras pertenecientes al **Grupo T** comprometieron a los linfocitos de los nódulos y los cordones esplénicos. Al igual que en el timo, las células linfoides evidenciaron cambios de picnosis, cariorrexis y cariólisis, observándose también la presencia de cuerpos apoptóticos (Fig. 33). Estas lesiones estuvieron presentes a las **8, 16 y 24 HPA**. A las **48 HPA**, las características de las células linfocíticas del **Grupo T** fueron similares a las del **Grupo C** (Fig. 34).

---

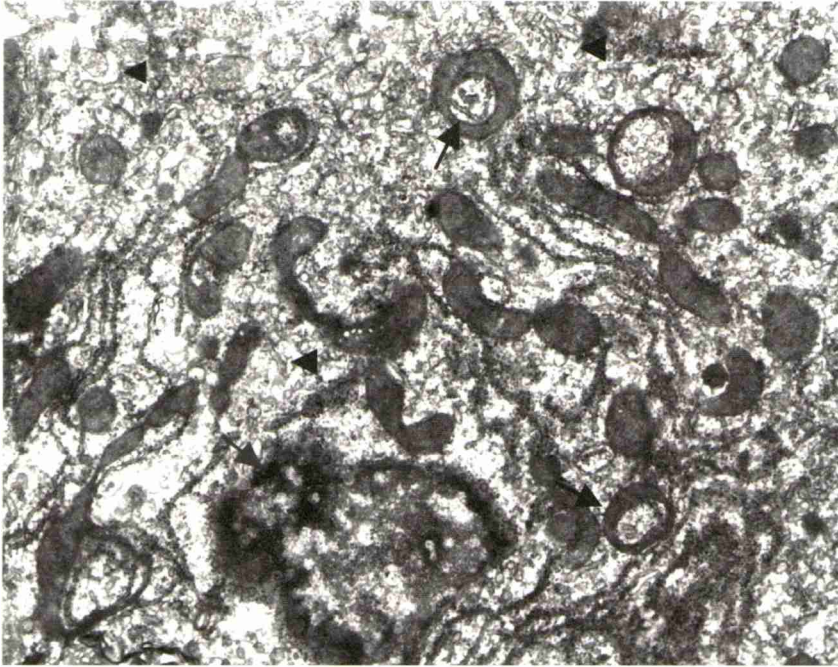
**\*Figura 20: Hepatocito de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Plegamiento de la membrana nuclear, condensación y marginación de la cromatina (→). Condensación y deformación de mitocondrias (→), ausencia de gránulos de glucógeno, desordenada disposición de las cisternas del RER y proliferación del REL (▶), x12000.

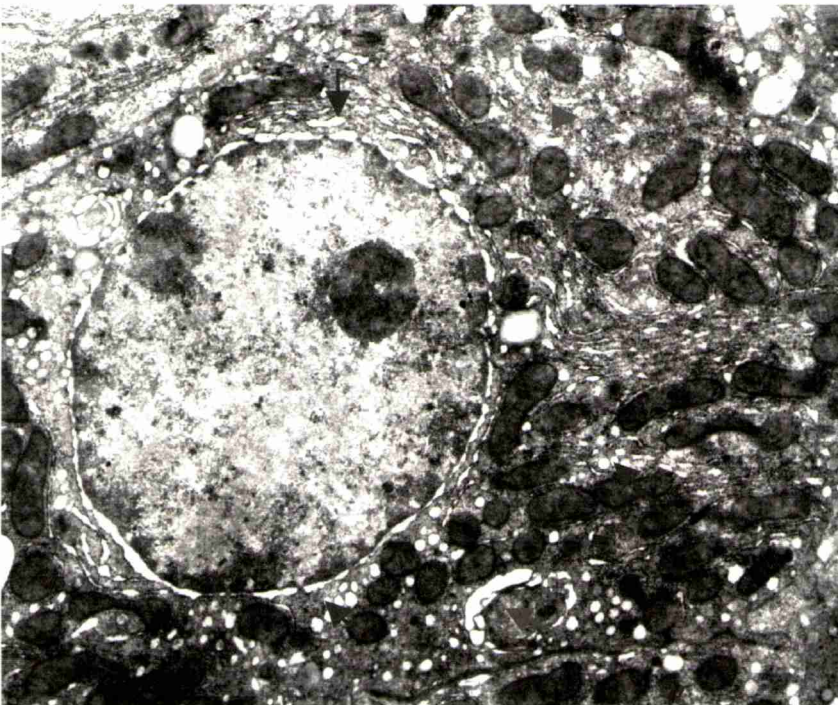
**\*Figura 21: Hepatocito de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Dilatación y vesiculización del RER (→). Hipertrofia y proliferación del REL (▶). Mitocondrias con matriz electrodensa homogénea y ausencia de gránulos densos. Dilatación de las cisternas del aparato de Golgi (→) y pérdida de las vesículas secretorias, x8500.

**Figura 20**



**Figura 21**



---

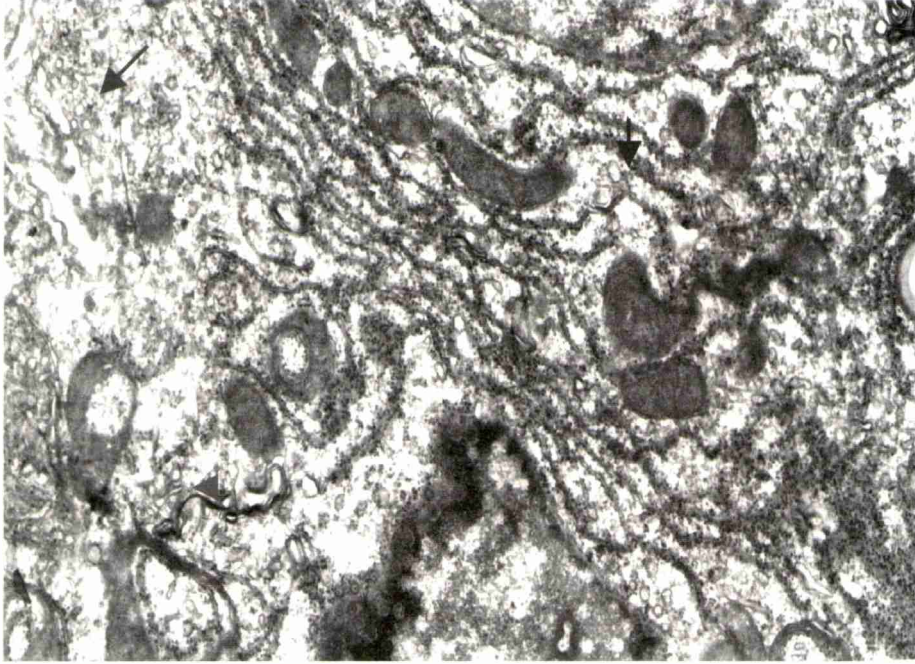
**\*Figura 22: Hepatocito de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Distribución irregular del RER en la matriz citoplasmática (→). Dilatación de las cisternas del aparato de Golgi (→). Presencia de figuras de mielina (▶), x13000.

**\*Figura 23: Hepatocito de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Dilatación, vesiculización y degranulación del RER (→). Numerosos ribosomas libres en el citoplasma (▶), x16000.

**Figura 22**



**Figura 23**

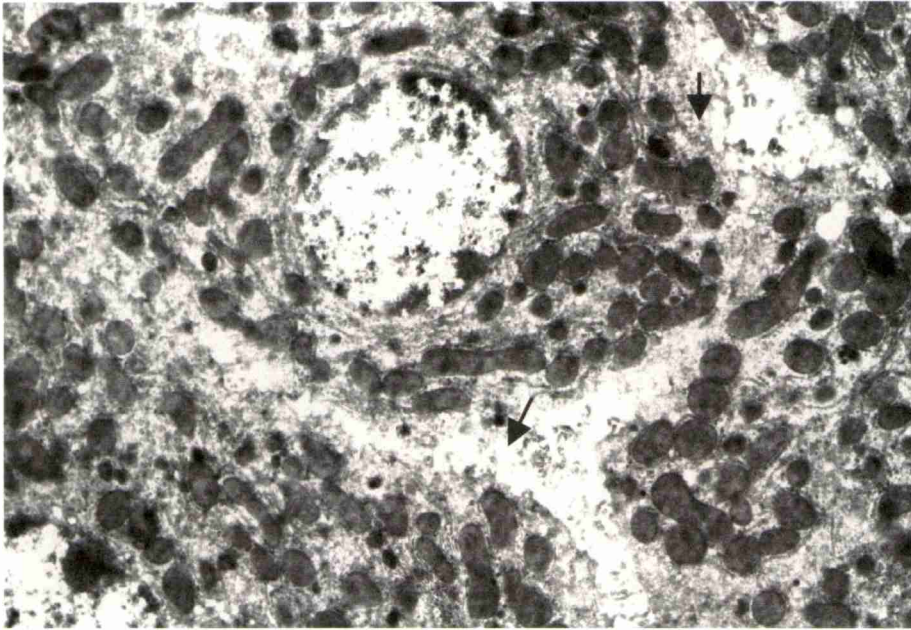


---

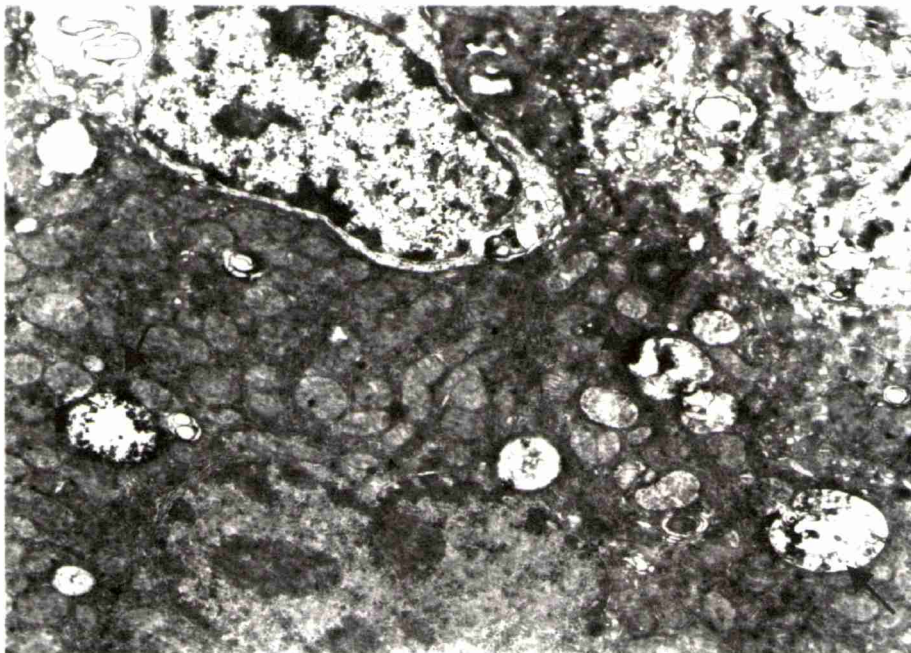
**\*Figura 24:** Hepatocito de ratón tratado con micotoxina T-2, 16 HPA.  
Dilatación de los canaliculos biliares. Reducción y deformación de las microvellosidades de la superficie secretoria del hepatocito (→), x4000.

**\*Figura 25:** Hepatocito de ratón tratado con micotoxina T-2, 16 HPA.  
Vacuolas autofágicas intracitoplasmáticas (→). En el ángulo superior derecho se observa parte de un hepatocito con cambios necróticos, x5000.

**Figura 24**



**Figura 25**



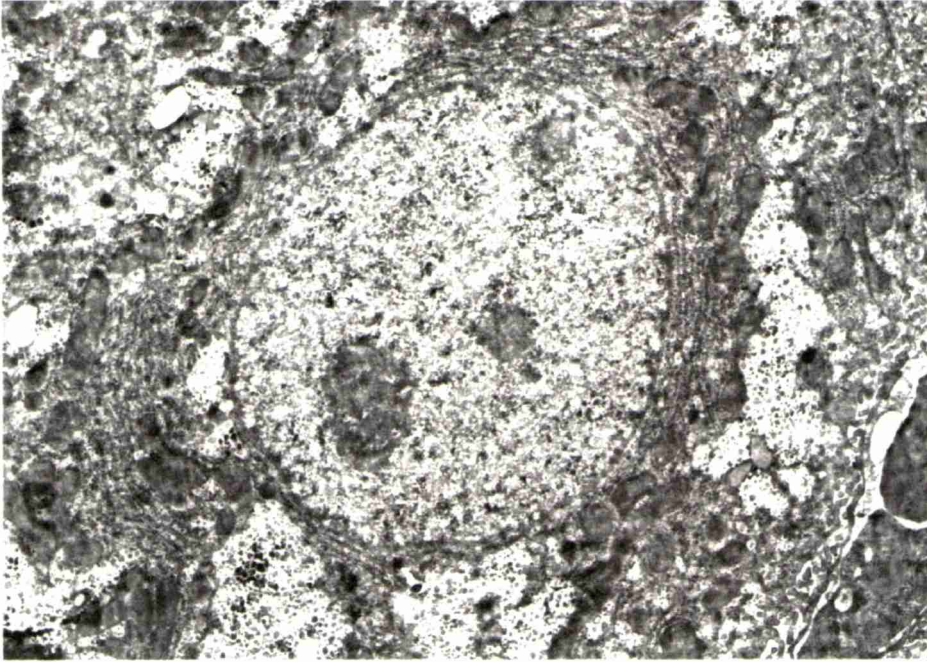
---

**\*Figura 26:** Hepatocito de ratón tratado con micotoxina T-2, 24 HPA.  
Numerosas partículas de glucógeno. El RER presenta una disposición ordenada, x6500.

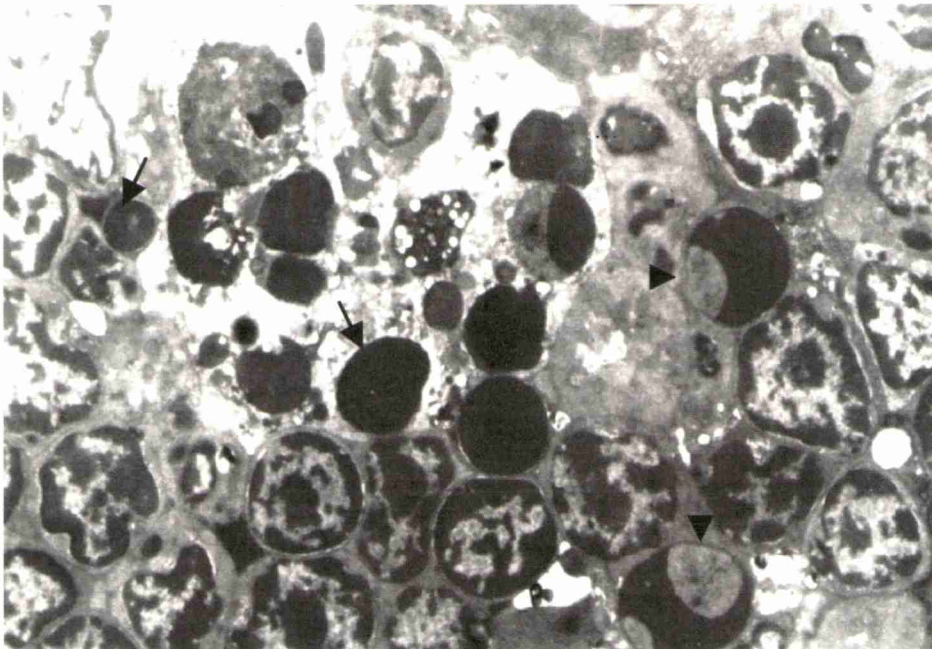
**\*Figura 27:** Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, corteza, 8 HPA.  
Numerosos linfocitos con cambios necróticos. Picnosis y cariorrexis nuclear (→).  
Cuerpos apoptóticos con remanentes de citoplasma y núcleo (▶), x4000.



**Figura 26**



**Figura 27**

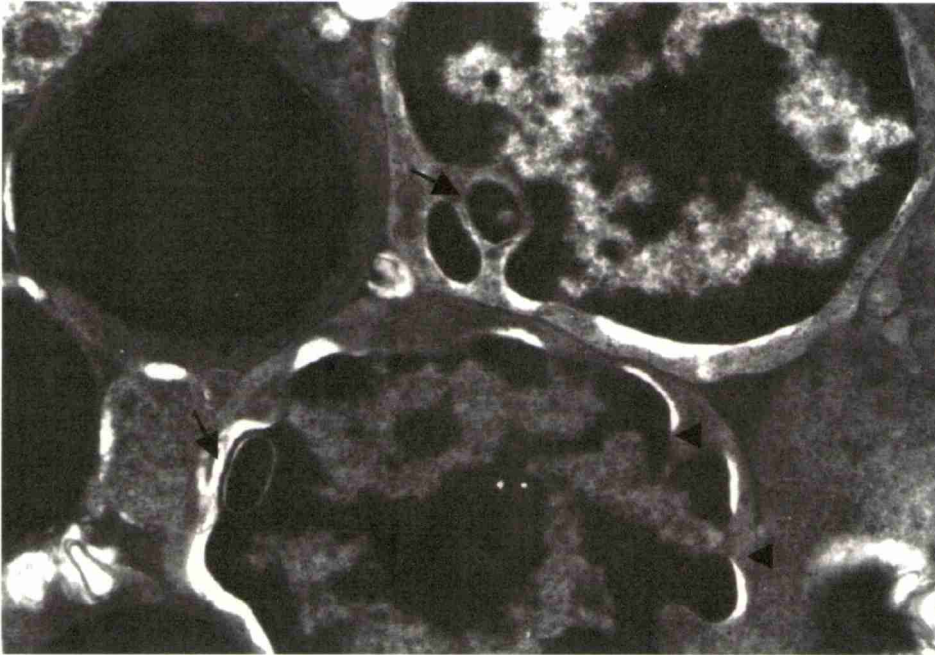


---

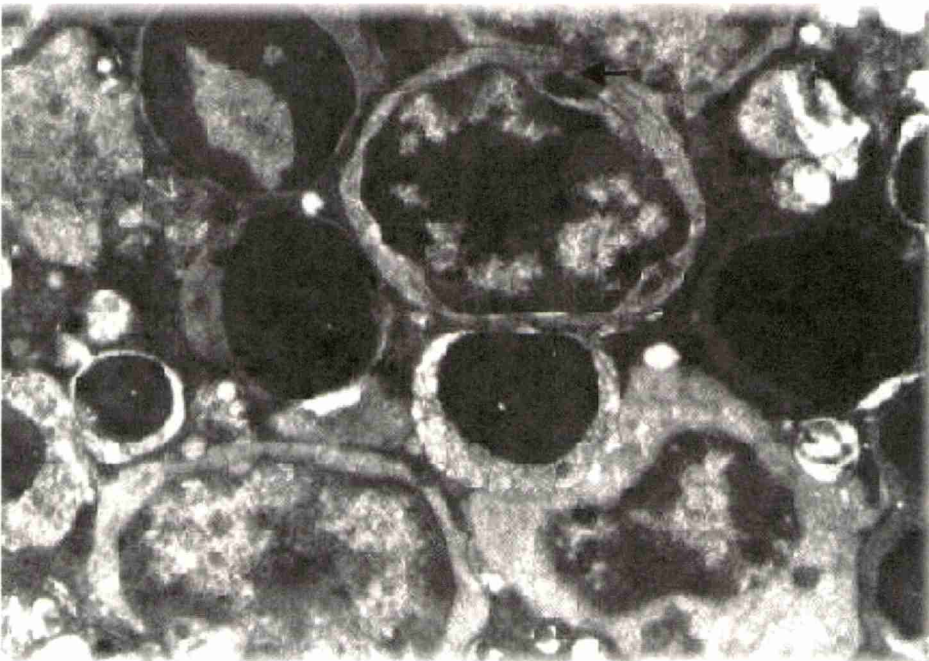
**\*Figura 28:** Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, corteza, 16 HPA.  
Linfocitos tímicos con fragmentos de material nuclear parcial o totalmente separados de la masa nuclear principal (→) e invaginaciones de la membrana nuclear (▶), x15000.

**\*Figura 29:** Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, corteza, 16 HPA.  
Linfocitos con picnosis y proyección pedunculada de material nuclear (→), x6000.

**Figura 28**



**Figura 29**

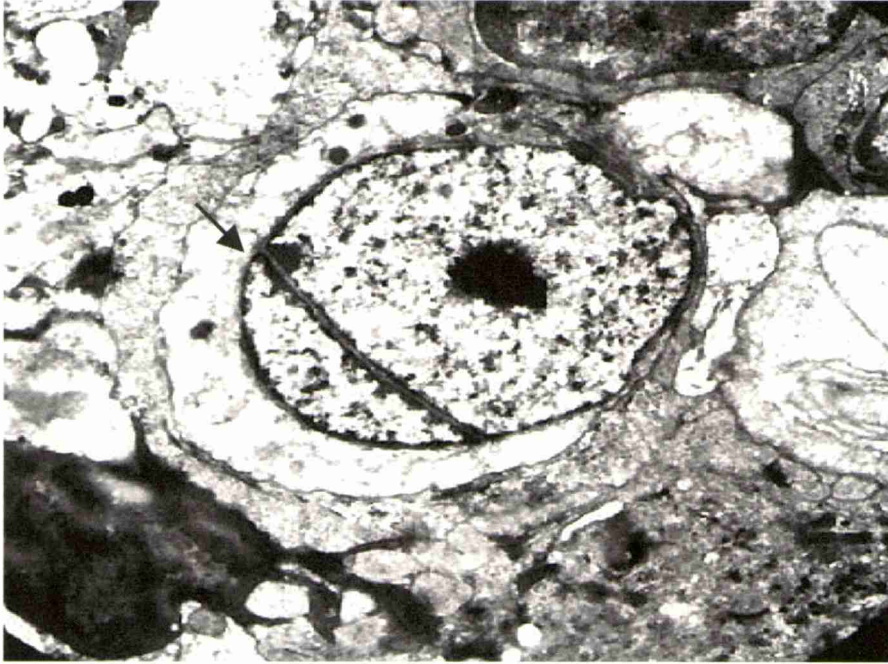


---

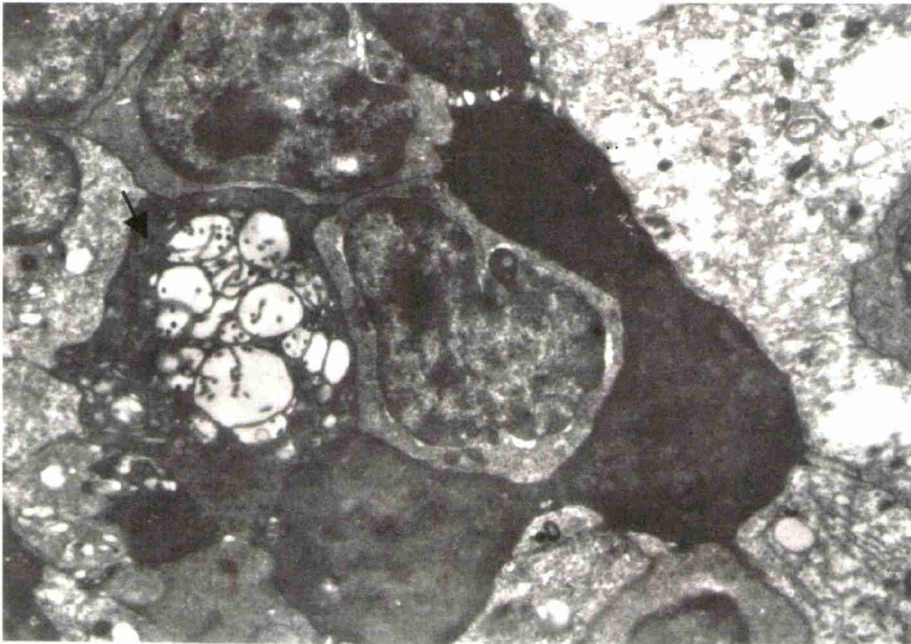
**\*Figura 30:** Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, corteza, 16 HPA.  
Núcleo celular escindido completamente por una profunda invaginación de la membrana nuclear (→), x6800.

**\*Figura 31:** Timo de ratón tratado con micotoxina T-2, médula, 16 HPA.  
Célula reticuloepitelial con formaciones similares a canalículos intracitoplasmáticos (→), x6700.

**Figura 30**



**Figura 31**

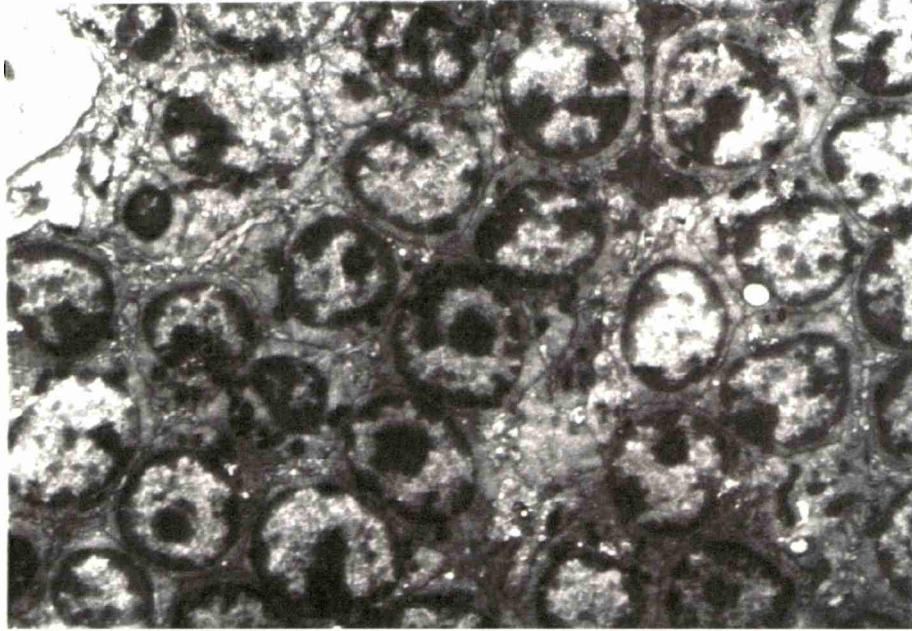


---

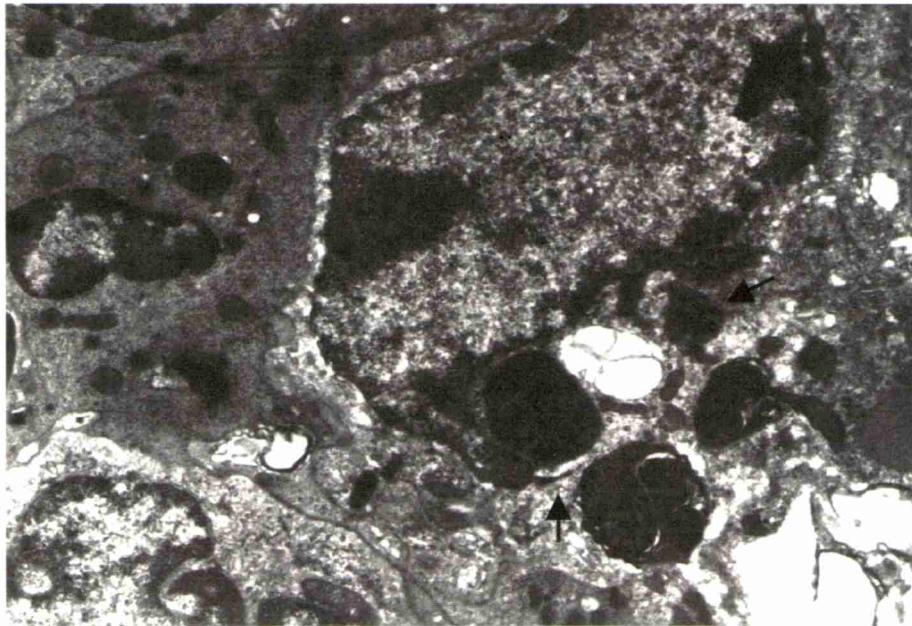
**\*Figura 32: Timo de ratón del grupo control-no tratado, corteza.**  
Imagen de linfocitos corticales normales, x3200.

**\*Figura 33: Bazo de ratón tratado con micotoxina T-2, pulpa blanca, 8 HPA.**  
Célula reticuloepitelial con cuerpos apoptóticos en el citoplasma (→), x11600.

**Figura 32**



**Figura 33**

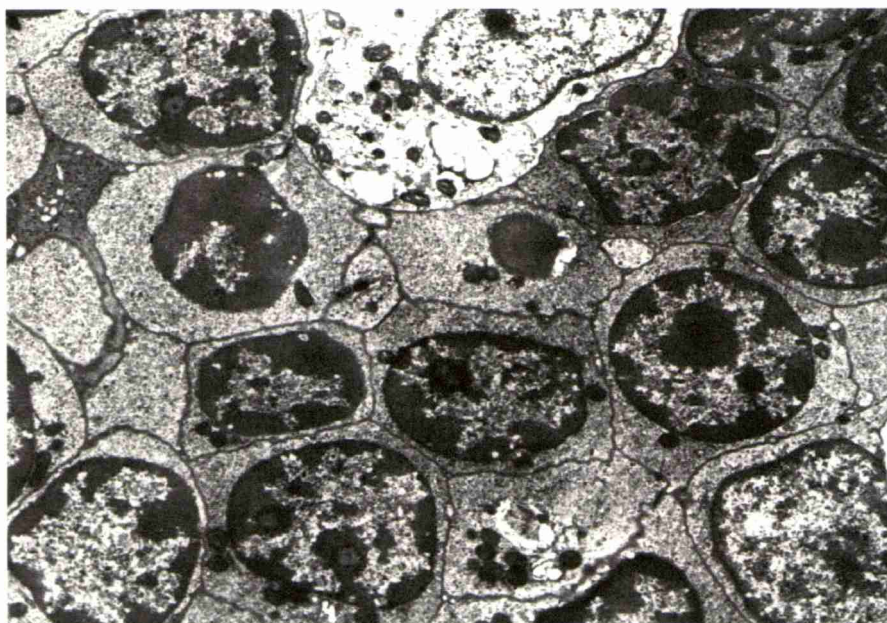


---

**\*Figura 34:** Bazo de ratón del grupo control-no tratado, pulpa blanca.  
Linfocitos y célula reticuloepitelial normales, x5700.



**Figura 34**



## **◆ DISCUSIÓN**

La micotoxina T-2 se caracteriza por sus efectos radiomiméticos, siendo un potente inhibidor de la síntesis proteica y del ADN en las células eucarióticas. Al igual que con el resto de los tricotecenos, las características bioquímicas de la micotoxina T-2 la hacen responsable de una potente acción citotóxica (157), observándose que provoca un marcado daño sobre las células de rápida división del tracto gastrointestinal, bazo, timo, nódulos linfáticos, médula ósea y testículos en diversas especies animales (65).

En ratones, la micotoxina T-2 administrada por diferentes vías y en dosis variadas, causó lesiones de diversa intensidad en numerosos órganos (67, 130, 131). En nuestro trabajo se observaron lesiones en los órganos del tracto gastrointestinal, hígado, páncreas, timo, bazo, linfonódulo mesentérico y médula ósea.

En el estómago, la lesión principal consistió en necrosis de las células epiteliales de las unidades cimogénicas. El mayor grado de necrosis se observó a las 8 y 16 HPA con compromiso de las células de la región del istmo, mientras que a las 24 HPA resultaron con mayor daño las células de la base. En ambas regiones, transcurridas 48 HPA, se observó un descenso significativo en el grado de células necróticas, si bien este valor continuó siendo elevado en la región de la base. Por otro lado, el grado de necrosis en las células del cuello fue alto en todos los tiempos experimentales. Además de las lesiones descritas, cuatro animales, a las 24 y 48 HPA evidenciaron necrosis y descamación del epitelio de revestimiento, con hemorragia superficial. Este último hallazgo coincide con lo observado por Lee y col. (67) en ratones inoculados con micotoxina T-2 bajo similares condiciones que en nuestro

experimento. Este autor describe edema en la mucosa, citolisis y descamación epitelial ya a partir de las 3 HPA, con necrosis de las células de la unidad cimogénica, exposición de elementos vasculares de la lámina propia y acúmulo de sangre en la luz, a las 24 HPA. Algunos autores detallan la existencia de hiperemia, hemorragia y necrosis del epitelio del estómago en otras especies animales que recibieron una única dosis de micotoxina T-2 siguiendo la vía digestiva (6, 22, 46, 65, 80).

En nuestro trabajo, la necrosis y la descamación del epitelio de revestimiento, así como también el alto grado de necrosis en las células más superficiales de las glándulas fúndicas (región del istmo), podrían explicarse como el resultado del contacto directo de la micotoxina administrada por vía intragástrica o como consecuencia del efecto citotóxico de esta toxina sobre la microvasculatura de la mucosa del estómago. En el primer caso, el efecto por contacto directo parece jugar un papel importante, según lo descrito por Terao y col. (145), en el desarrollo de necrosis y hemorragia en la mucosa del tracto digestivo. En el segundo caso, a partir del daño que la micotoxina T-2 provoca sobre los endotelios se desarrollaría una isquemia secundaria que favorecería el desarrollo de cambios degenerativos y necrosis epitelial. Un mecanismo de acción similar es sugerido por Pang y col. (100) para explicar la lesión dérmica en cerdos luego de la aplicación tópica de micotoxina T-2.

En cambio, la necrosis observada en las células del cuello y de la base glandular, regiones que concentran la mayor actividad mitótica y de síntesis de proteínas, probablemente fue la manifestación directa de la acción citotóxica de la micotoxina T-2. Trabajos realizados en ratas intoxicadas con otro tricoteceno (fusarenon x) han demostrado que las células de la base y del cuello también fueron las

más susceptibles a la acción de la micotoxina, con evidente formación de cuerpos apoptóticos (72, 73).

El descenso en el grado de necrosis celular observado a las 48 HPA tendría relación con la rápida absorción y metabolización de la toxina, así como con la capacidad regenerativa del epitelio del estómago. Ratonés a los que se administró micotoxina T-2 [ $^3\text{H}$ ] evidenciaron una rápida disminución de la radioactividad en los órganos estudiados, no detectándose cantidades medibles luego de las 72 horas posteriores a la inoculación. Sobre esta base, es concebible que, tanto la incorporación como la eliminación de los metabolitos tóxicos, tengan lugar poco después de su administración sin llegar a acumularse en los tejidos (82). Por otro lado, y teniendo en cuenta que el ritmo de renovación de las células del istmo, precursoras de las células epiteliales de superficie, es de 2,6 días, una vez transcurridas las 48 HPA existiría una regeneración total del epitelio de revestimiento y casi completa de las células mucosas del istmo. El alto grado de necrosis, aún observable a las 48 HPA, en las regiones del cuello y de la base se entiende al considerar que la porción secretora de las glándulas se regenera más lentamente que la capa de revestimiento (57, 59).

En el intestino, las lesiones observadas consistieron principalmente en la presencia de células necróticas en el epitelio de las criptas de Lieberkühn, entre las células linfoides de la lámina propia y en las placas de Peyer. Sólo en algunos casos, a las 8 y 16 HPA, se observaron degeneración y necrosis de los enterocitos del epitelio de revestimiento. También fue evidente una disminución en el número de mitosis celulares.

Los segmentos estudiados del intestino delgado, duodeno e íleon, presentaron

el mayor grado de necrosis de células epiteliales y linfoides en todos los tiempos del experimento y, sobre todo, a las 8 y 16 HPA. Si bien el número de células necróticas, durante ese período, también fue alto en el ciego y en el colon, resultó significativamente menor que el observado en el intestino delgado.

Coincidentemente con el período en que fue mayor la necrosis celular en los distintos segmentos intestinales (8 y 16 HPA), el porcentaje de mitosis resultó significativamente bajo. De modo similar, Schiefer y col. (130) han observado, en ratones intoxicados con micotoxina T-2, que a mayor cantidad de células necróticas en las criptas menor fue el número de figuras mitóticas detectadas.

Los hallazgos descritos concuerdan con lo observado por diversos autores en ratones, cobayos, cerdos y pollitos que recibieron micotoxina T-2 por distintas vías (46, 80, 131, 148, 164). Contrariamente a lo observado en nuestra experiencia, Lee y col. (67) describen, básicamente, la presencia de edema y vasodilatación en las vellosidades del duodeno y del yeyuno, limitando la ocurrencia de necrosis celular sólo a las células del epitelio de revestimiento y a algunos linfocitos de la lámina propia. Por otro lado, destacan la ausencia de lesiones en íleon.

En nuestro estudio, la reducción en el porcentaje de mitosis y la necrosis de las células epiteliales de las criptas intestinales fueron evidentes ya a las primeras horas de administrada la micotoxina T-2. Si consideramos que, en el intestino sano, la regeneración epitelial se produce a partir de la intensa actividad mitótica de las células de la porción basal de las glándulas de Lieberkühn, las lesiones aquí descritas reflejan la acción radiomimética de la micotoxina T-2 y su efecto sobre las células de rápida división. La integridad observada en el epitelio de revestimiento, aún en las etapas de

mayor grado de necrosis de las células de las criptas, se explicaría teniendo en cuenta el corto tiempo de evaluación experimental.

La necrosis de las células linfoides de la lámina propia y de las placas de Peyer refleja una asociación entre el efecto inhibitorio de la micotoxina T-2 sobre la síntesis proteica y el daño en el sistema inmune. Li y col. (70) describen las características morfológicas de la necrosis observada en los linfocitos de las placas de Peyer en ratón y las relacionan con una disminución en la respuesta inmune local y sistémica.

Al igual que en el estómago, la tendencia a una recuperación de las lesiones, a partir de las 24 HPA, tendría relación con el corto tiempo de absorción y metabolización de la toxina. Sato y col. (125) han observado que la micotoxina T-2 y otros tricotecenos son rápidamente absorbidos, desde el sitio de administración, y distribuidos por distintos órganos (hígado, riñones, intestinos y otros). Si bien, como se ha señalado anteriormente, Matsumoto y col. (82) han demostrado que la micotoxina T-2 no se acumularía en los tejidos más allá de las 72 hs. de administrada, los mismos autores han observado que, luego de la administración de micotoxina T-2 [ $^3\text{H}$ ], la radioactividad específica detectada en el intestino delgado fue mayor que la del intestino grueso y continuó en un alto nivel durante las 48 horas posteriores al tratamiento. Esto explicaría el mayor daño observado, en nuestro trabajo, en el intestino delgado en comparación con el intestino grueso. A esto podría sumársele el efecto de la circulación enterohepática de la micotoxina T-2 y sus metabolitos conjugados. Coddington y col. (15) describen en ratas la recuperación, en bilis, de metabolitos biológicamente activos, tales como 3'-OH HT-2, T-2 tetraol y HT-2, luego de que la micotoxina T-2 [ $^3\text{H}$ ] fuese

administrada intraduodenalmente. De este modo, es probable que en nuestro caso, la micotoxina T-2 haya sido excretada como metabolitos aún tóxicos, a través de la bilis. Esta recirculación metabólica prolongaría el efecto tóxico de la micotoxina T-2 (15).

Las lesiones observadas en el páncreas consistieron en necrosis individual de las células acinosas y disminución en la cantidad de gránulos de zimógeno, no observándose lesión alguna en los islotes de Langerhans. El efecto de la micotoxina T-2 sobre el páncreas ha sido estudiado previamente por otros autores en cerdos, habiéndose encontrado cambios de degeneración y necrosis en las células acinares (99).

La actividad de síntesis proteica en el páncreas es de importancia primordial y está dirigida a la producción de grandes volúmenes de secreción exocrina (56). Las características morfológicas de las células acinosas se corresponden con su función de síntesis, siendo células muy ricas en ARN (57). Según lo descrito por otros autores (99) la micotoxina T-2 provoca lesión en el retículo endoplásmico rugoso de las células acinosas. De este modo es probable que produzca una inhibición en la síntesis proteica al igual que lo que sucede en otros órganos.

El páncreas exocrino es un órgano lábil, susceptible a muchas influencias adversas de tipo tóxico, infeccioso o nutricional (56). La pérdida progresiva de los gránulos de zimógeno producida en los animales que recibieron micotoxina T-2 sería uno de los primeros cambios indicativos de la lesión degenerativa.

El hígado resultó otro de los órganos afectados por la micotoxina T-2. Las lesiones observadas, tanto en el estudio con microscopio óptico como con el

microscopio electrónico, consistieron, básicamente, en cambios relacionados con procesos de degeneración y necrosis celular. Estas alteraciones fueron evidentes ya a las 8 HPA, notándose una disminución significativa en las lesiones estudiadas a partir de las 16 HPA, con una imagen histológica cercana a la normal a las 48 HPA.

El efecto de la micotoxina T-2 sobre el hígado ha sido estudiado por diversos autores y desde distintos puntos de vista. Para algunos, el hígado es el órgano que mejor reflejaría la toxicidad de la micotoxina T-2, dada su distribución subcelular. De este modo, se ha observado que existe una asociación inmediata de la toxina y sus metabolitos con las fracciones nuclear, ribosómica y mitocondrial del hepatocito, conocidos sitios de acción de los tricotecenos (97). Otros autores centran su atención en los cambios bioquímicos celulares y en las variaciones de la bioquímica sanguínea. Estudios experimentales han evidenciado que la micotoxina T-2 indujo cambios en los valores de proteínas, glucosa, lípidos y enzimas séricas en ratas, ratones, conejos, cerdos, bovinos y aves (9, 91, 101, 113, 128, 143). Además, y con el fin de esclarecer el papel de la micotoxina T-2 en la injuria hepática, diversos autores han llevado a cabo experiencias basadas en la hipótesis que la micotoxina T-2 estimularía la peroxidación lipídica en el hígado. El daño observado en el sistema de membrana celular hepática sería iniciado por la producción de radicales libres y continuado en forma autocatalítica, como una reacción en cadena, conduciendo a un aumento de la peroxidación lipídica de las biomembranas (1, 113, 120, 142). De todos modos, para otros investigadores no queda claro si la peroxidación lipídica causada por la micotoxina T-2 participaría en la injuria hepática como un disparador, o si el daño en las membranas hepáticas sería previo a la estimulación de la peroxidación y consecuencia de un efecto tóxico general



(10, 150). Por otro lado, se han descrito disturbios en el sistema de las enzimas metabolizantes de drogas, con valores bajos en la actividad de la enzima anilina-hidroxilasa y en el nivel de citocromo P-450 en el hígado de ratas y ratones que recibieron la micotoxina T-2 en forma oral (32, 113).

Desde el punto de vista de la morfología hepática, la información disponible respecto del efecto de la micotoxina T-2 sobre el hígado es muy variable. Algunos autores no hallaron lesión alguna en el hígado de ratones, cobayos y cerdos luego de la reproducción de cuadros de intoxicación aguda y subaguda (43, 67, 80, 100, 130, 164). Otros autores describen cambios en el hígado de conejos, ratas, pollitos y lechones. En conejos, las lesiones consistieron en tumefacción hepatocelular centrolobulillar y moderada fibrosis portal y periportal (91). En ratas, se han descrito, principalmente, focos de necrosis celular y necrosis de células aisladas en todo el lobulillo (6, 63). En pollitos, las lesiones hepáticas consistieron en focos múltiples de necrosis coagulativa, hemorragia e hiperplasia de ductos biliares, principalmente en la región portal (46). En lechones se observaron una reducción del contenido de glucógeno hepático y hepatocitos con degeneración grasa (161).

A diferencia de lo expresado por Lee y col. (67), quienes resaltan la ausencia de lesiones en el hígado de ratones que recibieron 11 de mg T-2/Kg PV por intubación gástrica, en nuestro trabajo fueron evidentes los cambios hepáticos asociados a procesos de degeneración y necrosis celular.

Los cambios observados con el microscopio electrónico se correlacionan con aquellos detectados mediante el microscopio óptico. La hipertrofia y la proliferación del REL, así como la desaparición de las partículas de glucógeno se corresponden con la

acidofilia aumentada del citoplasma de los hepatocitos. Los cuerpos acidofílicos observados son resultado de la disposición en forma compacta, en el citoplasma, de las membranas del REL hiperplásico y de otras organelas.

La marginación y condensación de la cromatina nuclear, observadas con el microscopio electrónico, así como la ausencia de cromatina en otras áreas de la matriz nuclear, indicarían un aumento de la heterocromatina y una disminución de la eucromatina activa. Existen evidencias que apoyan la idea que la eucromatina es activa en la síntesis de ARN y ADN mientras que la heterocromatina muestra una escasa o nula actividad en las etapas de replicación y transcripción (35). Este hallazgo reflejaría la acción inhibitoria de los tricotecenos en la síntesis proteica y de ADN.

El daño del RER, observado con el microscopio electrónico, representa la evidencia más temprana de citotoxicidad y parece ir acompañado por una disminución en la síntesis proteica (145). La degranulación del RER y la desagregación de los polirribosomas hepáticos observados en nuestro estudio, coinciden con lo descrito por Trusal y col. (149) en hepatocitos de rata *in vitro*. Ueno (157) ha demostrado que uno de los primeros efectos de los tricotecenos es la desagregación de la estructura polisomal. Este autor estableció que la micotoxina T-2, al igual que otros tricotecenos, se une a los polisomas y ribosomas de las células eucarióticas, mostrando una alta afinidad por la subunidad 80s de los ribosomas. De este modo interfiere en el ciclo ribosómico, causando inhibición de las reacciones de iniciación y terminación (157).

La dilatación de las cisternas del complejo de Golgi y la pérdida de las vesículas asociadas fueron hallazgos coincidentes con lo descrito por Mollenhauer y col. (85). Estos cambios indicarían una acción inhibitoria de la micotoxina T-2 en el transporte de

las proteínas sintetizadas en el RER hacia el complejo de Golgi y en la formación de los gránulos de secreción.

En experimentos previos hemos observado que las lesiones hepáticas presentes en el RER, ribosomas y complejo de Golgi, estuvieron acompañadas por un descenso significativo y persistente, durante todo el período experimental, en los niveles séricos de proteínas totales y albúmina. Esto se consideró un reflejo del potente efecto inhibitorio de la micotoxina T-2 sobre la síntesis proteica (113).

El REL es vulnerable a la acción de algunas micotoxinas (145). Su activa participación en la metabolización de drogas y esteroides, a través del sistema de oxidasas de función mixta microsomal, hace interesante el análisis de los cambios morfológicos ante la injuria tóxica.

La proliferación del REL observada en nuestro trabajo puede considerarse como la expresión morfológica hepática de la producción de enzimas metabolizantes de drogas. En estudios previos (113), esta lesión del REL coincidió con un aumento de la actividad de anilina-hidroxilasa hepática a las 8 HPA, tanto en el Grupo C (control-no tratados) como en el Grupo T (toxina-tratados). En este caso, el aumento en la actividad enzimática pudo ser inducido por la administración de etanol al 20% como solución vehículo de la micotoxina T-2. Una vez transcurridas 16 HPA, los cambios en el REL, en los animales del Grupo T, persistieron sólo en los hepatocitos periportales, coincidiendo con un descenso persistente en la actividad de anilina-hidroxilasa.

Por otro lado, la ausencia de partículas de glucógeno, a las 8 HPA, fue total en las zonas 1, 2 y 3 del acino hepático. Esto también coincide con lo descrito por Mollenhauer y col. (85). A partir de las 16 HPA las partículas de glucógeno

reaparecieron en las zonas 2 y 3 del acino, alcanzando los valores del grupo C a las 24 HPA. En la zona 1 (periportal), en cambio, la ausencia de glucógeno persistió a las 16 HPA con una lenta recuperación a partir de las 24 HPA.

La proliferación del REL y la disminución de la cantidad de partículas de glucógeno son cambios que se asocian a la injuria tóxica hepática temprana (146). Se ha sugerido que el glucógeno en el citoplasma puede ejercer un efecto de protección contra reactivos tóxicos, atrapándolos antes de que dañen los componentes membranosos más vitales de la célula (60).

La persistencia de los cambios de degeneración y necrosis en los hepatocitos periportales, más allá de las 24 HPA, podría ser el resultado de una mayor exposición de estas células al compuesto tóxico sin metabolizar, que llega por sangre al lobulillo. Por otro lado, la actividad reducida de las enzimas biotransformantes en estas células no resultaría suficiente para degradar el compuesto original a metabolitos no tóxicos, prolongando el daño celular.

Las lesiones mitocondriales incluyeron condensación de la matriz y alteración de las crestas. Estos hallazgos fueron previamente descritos en el hígado de ratón (85), si bien la exposición, *in vitro*, de hepatocitos de rata a la micotoxina T-2 no produjo cambios ultraestructurales en las mitocondrias (149). En otras circunstancias se ha observado una interesante correlación entre las alteraciones morfológicas mitocondriales y su contenido de enzimas. Algunos autores han descrito variaciones en la morfología y orientación de las crestas mitocondriales asociadas a la exposición a altas concentraciones de O<sub>2</sub> y a la disminución en la actividad de citocromo-oxidasa (36). Por otro lado, Pace (96) demostró que la micotoxina T-2 inhibió el consumo de

oxígeno mitocondrial, tanto en hepatocitos aislados de hígados de ratas intoxicadas con micotoxina T-2 como en preparaciones mitocondriales tratadas con la micotoxina T-2 *in vitro*. Esto sugiere que la mitocondria es uno de los sitios de acción de la micotoxina T-2, existiendo una inhibición de la respiración hepática mitocondrial. En estas condiciones, se hallaría limitada la reducción de  $O_2$  a  $H_2O$  por la enzima citocromo-oxidasa generándose un acúmulo de radicales superóxido ( $O_2^-$ ) en la mitocondria (30). Este y otros radicales libres podrían eludir las defensas antioxidantes y provocar daño sobre las estructuras de membrana, los lípidos, las uniones sulfhidrilo de las proteínas y los nucleótidos del ADN celulares. De este modo se explicaría la necrosis celular hepática observada y sus características morfológicas.

El análisis estadístico de las lesiones microscópicas hepáticas refleja que el grado máximo de lesión se produjo a las 8 HPA con un descenso significativo a las 16 y 24 HPA, hasta alcanzar valores próximos a cero a las 48 HPA. En el examen con microscopio electrónico también se observó una tendencia a la normalización, a partir de las 24 HPA, si bien algunas de las lesiones ultraestructurales siguieron presentes en los hepatocitos periportales. A pesar de esta tendencia a la recuperación de las lesiones hepáticas dentro del período estudiado, el peso relativo del hígado se mantuvo por debajo de los valores registrados en los animales del Grupo C.

El timo resultó el órgano linfoideo más severamente dañado por la micotoxina T-2. Las lesiones microscópicas consistieron en necrosis linfocitaria y disminución en el número de linfocitos tímicos corticales y medulares.

Durante todo el período experimental la necrosis linfocitaria fue más evidente en la corteza que en la médula, aunque esta diferencia fue estadísticamente significativa

sólo a las 8 HPA. Los valores máximos de necrosis, en ambas regiones tímicas, se observaron a las 16 y 24 HPA. Contrariamente, la disminución en el número de células fue significativamente mayor en la médula que en la corteza, a las 8 y 16 HPA, si bien este valor fue aumentando en la corteza, hasta alcanzar su máximo a las 48 HPA. Estos hallazgos coinciden, en líneas generales, con lo descrito por diversos autores (39, 114, 130, 133, 148).

El mayor grado de necrosis observado en la corteza reflejaría el efecto radiomimético de la micotoxina T-2, teniendo en cuenta que los timocitos corticales son menos maduros que los medulares y que, en el timo, la actividad mitótica se concentra casi exclusivamente en la capa cortical (57, 121). Del mismo modo, el mayor grado de disminución en la cantidad de células registrado en la médula sería una consecuencia de la necrosis celular cortical que impediría la normal migración de los timocitos corticales hacia la médula y su maduración en ella (121). El mayor descenso en el número de células registrado en la corteza a las 48 HPA, junto a los valores aún altos de necrosis observados en esta etapa, brindaron, al examen histopatológico, la imagen de un área cortical desnuda y casi ausente con la sola persistencia de células reticulares componentes de la trama de sostén. Esta aparente persistencia del efecto de la micotoxina T-2 sobre la corteza tímica a las 48 HPA, podría tener relación con la necrosis observada, en nuestro trabajo, en células indiferenciadas de la médula ósea. De este modo, durante el período estudiado, no existiría posibilidad de repoblación de la corteza tímica a partir de la migración de células de la médula ósea (57). Por otro lado, la necrosis linfocitaria presente también en los órganos linfoides secundarios, estimularía a una migración aumentada de los linfocitos tímicos hacia aquellos órganos.

Esto agravaría la disminución celular persistente durante el período experimental.

El menor peso relativo del timo registrado en los animales del Grupo T respecto a los del Grupo C durante todo el período experimental y principalmente a las 48 HPA, se correspondería con los porcentajes de disminución en la cantidad de linfocitos tímicos corticales y medulares.

El estudio del timo con el microscopio electrónico reveló los detalles morfológicos de la necrosis linfocitaria observada. La condensación, fragmentación y lisis de la cromatina nuclear fueron evidentes, principalmente en los linfocitos tímicos corticales, a las 8 y 16 HPA. Estos cambios coinciden con lo descrito por Glávits y col. (39) y Shinozuka y col. (133). Otras lesiones nucleares, tales como proyecciones pedunculadas e invaginaciones de la membrana nuclear, evidentes en las primeras horas de administrada la micotoxina T-2, han sido asociadas a distintos procesos leucémicos y linfomatosos (35). En estos casos, se encontró que las alteraciones nucleares descritas se correlacionaron con anomalías cromosómicas y síntesis defectuosa de nucleoproteínas (35). Shinozuka y col. (133) han señalado la presencia de similares lesiones nucleares en ratones intoxicados con micotoxina T-2 en condiciones equivalentes a las de nuestro trabajo.

La formación de cuerpos apoptóticos, que aquí se detalla y que se ha descrito previamente (114), coincide con lo descrito por Kerr y col. (61). Estos autores hacen referencia a la apoptosis como mecanismo regulador de las poblaciones celulares animales. En el caso de la intoxicación con micotoxina T-2, Shinozuka y col. (133) han observado la formación de cuerpos apoptóticos en timo, con características morfológicas similares a las descritas en este trabajo. En el estudio mencionado se

detectaron linfocitos apoptóticos, no sólo mediante el examen ultraestructural sino, además, por la aplicación del método TUNEL para la detección *in situ* del ADN fragmentado y por el uso de la técnica de electroforesis en gel de agarosa para el ADN extraído de las muestras de timo. Por otro lado, Ueno y col. (160) comprobaron que la micotoxina T-2 y otros tricotecenos (roridina A, NIV y DON) indujeron la fragmentación del ADN *in vitro*, en células promielocíticas de origen leucémico (células HL-60), con cambios ultraestructurales característicos de la muerte celular apoptótica. Estas observaciones indicarían que la micotoxina T-2 podría actuar como disparador del mecanismo de apoptosis celular o “muerte celular programada” y conducir así, al daño morfológico inicial en las células tímicas. De este modo, la apoptosis acompañaría a la “muerte celular accidental” o necrosis linfocitaria también observada.

A las 16 y 24 HPA, sumados a los cambios nucleares ya descritos, se observaron en la médula tímica, células reticuloepiteliales con formaciones similares a vesículas intracitoplásmicas con proyecciones digitiformes. Se han utilizado términos tales como canalículos, lúmen y alvéolos para denominar dichos quistes (37). Estas estructuras han sido frecuentemente vistas en proximidad de los corpúsculos tímicos, en cobayos y ratones, sugiriéndose que se trataría de una de las manifestaciones de degeneración celular (62). En el timo de embriones de ratas, algunos autores han descrito la presencia de células medulares llamadas “células epiteliales hipertróficas”, con características similares a las señaladas en este estudio (163).

Si bien la función de las células reticuloepiteliales es, principalmente, actuar como soporte de las células linfoides, la estructura de vesículas y vacuolas citoplásmicas se relacionaría con la producción y liberación de hormonas tímicas. Es



conocido que el timo secreta sustancias biológicamente activas que estimulan la linfopoyesis en general y la diferenciación de las células inmaduras de la médula ósea orientada a la formación de linfocitos T (57, 118). De acuerdo con esto, la presencia de estructuras canaliculares en las células reticuloepiteliales con mayor frecuencia en las muestras procesadas de los animales del Grupo T, indicaría un aumento en la producción de sustancias tímicas linfopoyéticas como respuesta a la necrosis y disminución en el número de los linfocitos tímicos.

El bazo, otro de los órganos linfoides afectados, evidenció cambios necróticos similares a los observados en el timo. Los valores indicativos de un mayor grado de necrosis linfocitaria se registraron a las 8 y 16 HPA, indicando una manifestación de la acción de la micotoxina T-2 más temprana que en el timo. Esto coincide con lo descrito por Schieffer y col. (131). De igual modo, una disminución significativa en la cantidad de células necróticas observadas tanto en los nódulos como en los cordones esplénicos, fue evidente ya a partir de las 24 HPA. Sin embargo, y pese a que las lesiones en bazo mostraron una tendencia regresiva dentro de las 48 HPA, el peso relativo del órgano se mantuvo significativamente por debajo del de los animales del Grupo C durante todo el período experimental. Esto, al igual que en timo, podría tener relación con la aparente disminución en el número de células linfoides observada. La menor cantidad de linfocitos en bazo sólo fue evidente en los cordones esplénicos (pulpa roja) y no en los nódulos linfáticos (pulpa blanca), lo que impidió obtener datos suficientes para su posterior evaluación estadística. A diferencia de lo expresado en este estudio, otros autores (39, 133, 148) señalan la presencia de folículos linfoides atróficos y con una marcada disminución de las células que los constituyen.

El examen del bazo con el microscopio electrónico reveló lesiones en los folículos linfoides de iguales características pero de aparente menor severidad que las observadas en el timo. Esto coincide con lo descrito por Shinozuka y col. (133).

El linfonódulo mesentérico y los agregados linfoides intestinales (placas de Peyer) también resultaron dañados por la micotoxina T-2. Al igual que en el bazo y en el timo, la lesión microscópica consistió, principalmente, en necrosis linfocitaria presente tanto en las zonas T como B dependientes. Este hallazgo coincide con lo descrito por diversos autores en ratones, cobayos, conejos, cerdos y aves (22, 39, 46, 70, 80, 91, 130, 133, 161).

Como se señalara anteriormente, a pesar de la destrucción celular observada, el bazo no presentó disminución en el número de linfocitos de los folículos linfoides. En el linfonódulo mesentérico, en cambio, hubo una importante reducción en la cantidad de linfocitos corticales y medulares a las 16 HPA. De todos modos, entre las 24 y 48 HPA se produjo un incremento en la densidad celular. Esto indicaría que, probablemente, haya existido una migración celular aumentada desde los órganos linfoides primarios a los secundarios.

## **◆CONCLUSIONES**

**\*La micotoxina T-2 causó alteraciones morfológicas celulares y subcelulares en estómago, intestino delgado y grueso, páncreas, hígado, timo, linfonódulo mesentérico y bazo.**

**\*Las lesiones principales observadas consistieron en:**

**-necrosis de las células epiteliales de las glándulas fúndicas del estómago y de las criptas del intestino y reducción del porcentaje de mitosis.**

**-necrosis, apoptosis y disminución en el número de células linfoides del timo, linfonódulo mesentérico, bazo y placas de Peyer.**

**-necrosis individual de las células parenquimatosas del hígado y páncreas.**

**\*Dentro de los órganos del sistema digestivo, el duodeno y el íleon fueron los más afectados. El mayor daño se observó a las 8 y 16 HPA. A partir de las 24 HPA se evidenció una tendencia a la recuperación de las lesiones.**

**\*Dentro de los órganos del sistema hematopoyético, el timo resultó el órgano más severamente dañado. La necrosis linfocitaria alcanzó valores máximos a las 16 y 24 HPA, comprometiendo, en mayor grado, a los linfocitos corticales. En este órgano las lesiones persistieron durante todo el período experimental.**

**\*En todos los órganos estudiados, excepto en el timo, se observó una recuperación de las lesiones casi completa al final del período experimental.**

**SECCION II**  
**ESTUDIO LECTINHISTOQUÍMICO**

**\*Objetivo específico:** Evaluar las posibles variaciones en la presencia y localización de residuos hidrocarbonados del tracto gastrointestinal respecto al patrón normal.

**◆ MATERIALES Y METODOS**

(ver **Sección I:** animales, micotoxina y diseño experimental. Páginas 24 y 25)

**\*Lectinas:** se utilizaron 7 lectinas biotiniladas (Vectastain Elite, Vector Labs. Inc., Burlingame, CA, USA). En el cuadro 1 se indican su abreviatura, especificidad por los hidratos de carbono y concentración utilizada.

**CUADRO 1****Lectinas utilizadas para la identificación de residuos hidrocarbonados en cortes de tejidos**

Lectina	Procedencia	Especificidad por HC	Concentración
<u>I- glucosa/manosa</u> <b>Con A</b>	<i>Canavalia ensiformes</i> (jack bean)	$\alpha\text{Man}>\alpha\text{Glc}>\text{GlcNAc}$	30 $\mu\text{g/ml}$
<u>II-N-acetilglucosamina</u> <b>WGA</b>	<i>Triticum vulgaris</i> (wheat germ)	$\text{GlcNAc } (\beta 1,4\text{GlcNAc})$ $>\beta\text{GlcNAc}>\text{Neu5NAc}$	10 $\mu\text{g/ml}$
<u>III-N-acetilgalactosamina/ Galactosa</u> <b>SBA</b>	<i>Glycine maximsus</i> (soy bean)	$\alpha$ y $\beta\text{GalNAc}>\alpha$ y $\beta\text{Gal}$	30 $\mu\text{g/ml}$
<b>DBA</b>	<i>Dolichos biflorus</i> (horse gram)	$\text{GalNAc}\alpha 1,3\text{GalNAc}>>$ $\alpha\text{GalNAc}$	30 $\mu\text{g/ml}$
<b>PNA</b>	<i>Arachis hypogaea</i> (peanut)	$\text{Gal } \beta 1,3\text{GalNAc } >$ $\alpha$ y $\beta\text{Gal}$	30 $\mu\text{g/ml}$
<b>RCA-I</b>	<i>Ricinus communis</i> (castor bean)	$\beta\text{Gal}>\alpha\text{Gal}>>\text{GalNAc}$	30 $\mu\text{g/ml}$
<u>IV-L-fucosa</u> <b>UEA-1</b>	<i>Ulex europaeus I</i> (gorse seed)	$\alpha\text{L-Fuc}$	30 $\mu\text{g/ml}$

Man: manosa; Glc: glucosa; GlcNAc: N-acetilglucosamina; NeuNAc: ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico); Gal: galactosa; GalNAc: N-acetilgalactosamina; Fuc: fucosa (21)

**\*Procedimiento:** el estudio lectinhistoquímico se realizó sobre cortes de los distintos segmentos intestinales (duodeno, íleon, ciego y colon) de acuerdo con la técnica descrita por Quiroga y col. (115). Se utilizaron muestras provenientes de 16

animales pertenecientes al **Grupo T** sacrificados a las 8, 16, 24 y 48 HPA (4 animales por cada tiempo experimental) y de 1 animal perteneciente al **Grupo C** sacrificado a las 8 HPA. Se prepararon portaobjetos revestidos con una película adhesiva, sumergiéndolos en una solución de neoprene al 0,2% en toluol. Sobre estos portaobjetos se adhirieron cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espesor que se desparafinaron y rehidrataron por pasajes por xilol y etanol en concentraciones decrecientes. El bloqueo de la peroxidasa endógena se realizó mediante la incubación de los cortes con una solución de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) al 3% en metanol absoluto, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. La tinción inespecífica de fondo se redujo cubriendo las muestras con una solución de albúmina bovina al 0,1 % en PBS, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron, durante 12 horas a 4 °C, con las lectinas biotiniladas en las concentraciones indicadas en el cuadro 1. Posteriormente, se adicionó una solución del complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) (Kit Vectastain ABC System, Vector Labs. Inc., Burlingame, CA, USA), preparada según las indicaciones de su fabricante, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de la peroxidasa se reveló por inmersión de los cortes en una solución de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) al 0,02% y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,05% en buffer Tris-HCl 0,05M (pH 7,6) (20 mg en 100 ml de buffer Tris). Se realizó un doble control negativo, bloqueándose cada lectina con el azúcar respectivo y sustituyendo las lectinas por PBS.

**\*Análisis estadístico:**

Se observaron las muestras provenientes de los **grupos T y C** teniendo en cuenta, en cada caso, el tramo intestinal estudiado (duodeno, íleon, colon y ciego) y el tiempo transcurrido posinoculación (8, 16, 24 y 48 HPA).

**-Intestino:** los cortes de intestino se estudiaron mediante la observación de 4 campos microscópicos elegidos al azar (objetivo 40x). En cada campo se evaluó la reactividad, frente a las siete lectinas, de las células del epitelio de revestimiento y del epitelio de las criptas, incluyendo las células caliciformes. En todos los casos, se determinaron la **intensidad de la respuesta** observada así como su **localización celular**.

La **reactividad** frente a las diferentes lectinas se graduó de 0 a 3 según la **intensidad de la coloración:**

\*grado 0: negativa

\*grado 1: débilmente positiva

\*grado 2: moderadamente positiva

\*grado 3: fuertemente positiva.

A partir del análisis estadístico de los números enteros indicadores de grado de intensidad de coloración (grados 0 a 3) se obtuvieron valores intermedios (números decimales) que se expresaron como la **media** (valor promedio indicador de grado) para cada órgano estudiado.

De acuerdo a su **localización**, el área reactiva se identificó en el polo apical de la superficie celular correspondiente al glucocálix y en la región supranuclear, correspondiente al complejo de Golgi.

Los valores numéricos obtenidos se analizaron, posteriormente, por métodos estadísticos (Pruebas de Fisher y Chi cuadrado) (138, 139). Un valor de  $P < 0,05$  se consideró significativo.

Se realizó un análisis estadístico preliminar con los datos provenientes de los animales toxina-tratados (**Grupo T**) y control (**Grupo C**) para determinar la existencia de diferencias entre las siete lectinas. Sobre la base de los resultados obtenidos, el estudio se centró en la comparación de la intensidad de la reacción entre las muestras de los **Grupos T y C**, frente a las lectinas **RCA-1, UEA-1, Con A y WGA**, con afinidad por monosacáridos diferentes.

De este modo se procedió al análisis de cada una de las cuatro lectinas mencionadas, evaluando la reactividad de las células en los distintos segmentos intestinales y considerando las HPA.

## **◆ RESULTADOS**

No se observaron diferencias significativas entre la reactividad de las muestras del **Grupo T** y las muestras del **Grupo C**, frente a cada una de las cuatro lectinas estudiadas. Con la lectina **RCA-1** (Tabla 16), se observó que la reactividad de las células varió entre grados 0 y 2. Se observaron diferencias significativas entre los distintos tramos intestinales, siendo menor la reactividad en colon (grado 1). Las células del epitelio de revestimiento de la vellosidad evidenciaron, en todos los segmentos intestinales, mayor intensidad de reacción que las células de las criptas. En cada célula, la tinción fue más evidente en la superficie de membrana (glucocálix) que en el área correspondiente al complejo de Golgi. Las células caliciformes se tiñeron



débilmente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (Fig. 35).

Con la lectina **UEA-1** (Tabla 16), la reactividad de las células fue de grado 2, no observándose diferencias significativas entre los distintos tramos intestinales. Las células del epitelio de revestimiento resultaron significativamente más reactivas que las de la cripta, observándose que el área correspondiente al glucocálix presentó una mayor intensidad de tinción que el área del complejo de Golgi. Las células caliciformes evidenciaron una moderada positividad (Fig. 36).

Con las lectinas **WGA** y **Con A** (Tabla 16), la reactividad de las células varió entre los grados 1 y 2 (WGA) y grados 0 y 2 (Con A). Frente a ambas lectinas, el colon resultó el segmento intestinal menos teñido, siendo el epitelio de revestimiento el que evidenció mayor grado de tinción. En ambos casos, la superficie celular (glucocálix) presentó mayor grado de coloración que el área celular supranuclear (complejo de Golgi) y que las células caliciformes. Prácticamente, las células caliciformes no reaccionaron frente a la lectina **Con A**.

---

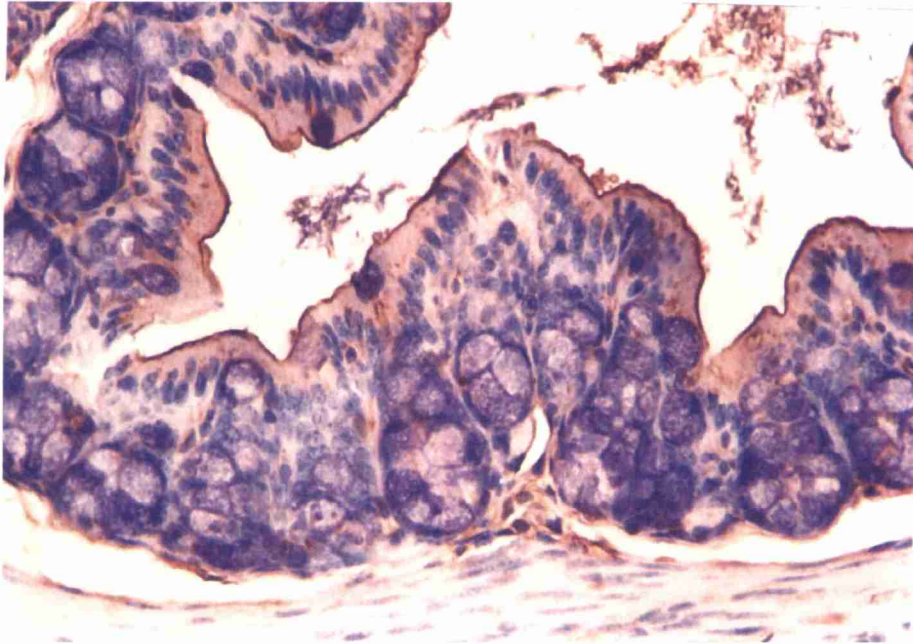
**\*Figura 35: Colon de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Intensa reactividad en el epitelio de revestimiento de la vellosidad y moderada reactividad en la zona correspondiente al complejo de Golgi. Las células caliciformes se observan sin teñir. Lectina RCA-1, objetivo 20x.

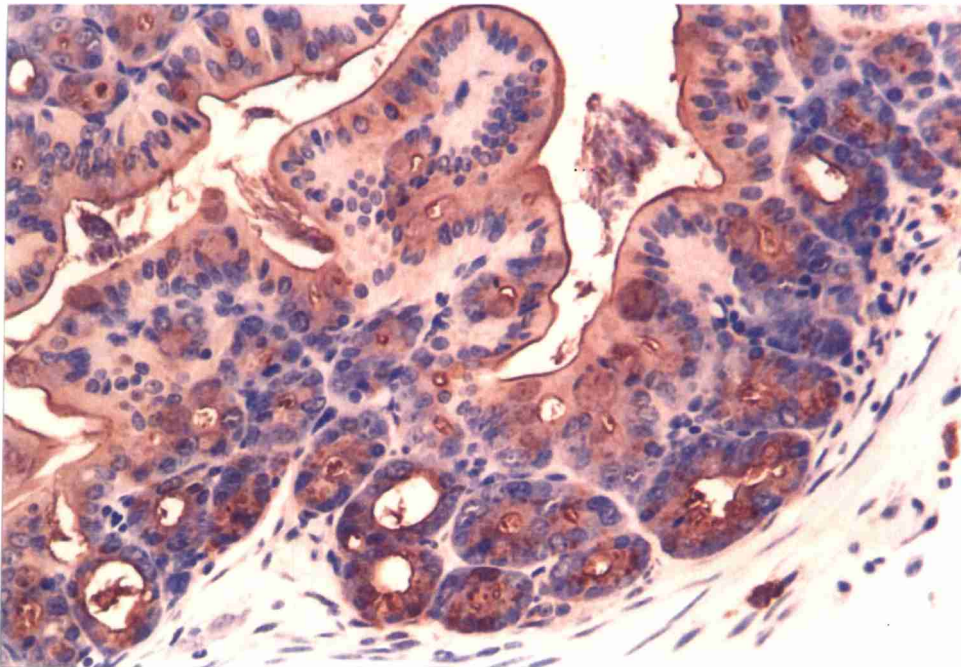
**\*Figura 36: Colon de ratón tratado con micotoxina T-2, 8 HPA.**

Reactividad intensa en el epitelio de revestimiento y en el de las criptas (área correspondiente al glucocáliz). Células caliciformes moderadamente positivas. Lectina UEA-1, objetivo 20x.

**Figura 35**



**Figura 36**



**TABLA 16 - Reactividad lectinohistoquímica del intestino de ratones del grupo T****\*Lectina RCA-1**

	Sitio anatómico				Epitelio		Detalle celular		
	Duodeno	íleon	ciego	colon	revestimiento	cripta	Célula caliciforme	Ap. Golgi	Glucocálix
<b>Media</b>	1,54 <sup>a</sup>	2,00 <sup>b</sup>	1,64 <sup>b</sup>	1,00 <sup>c</sup>	1,88 <sup>a</sup>	1,21 <sup>b</sup>	0,72 <sup>a</sup>	1,25 <sup>b</sup>	2,67 <sup>c</sup>
<b>ds</b>	1,42	1,24	0,93	1,17	1,24	1,17	0,79	1,24	0,72
<b>n</b>	99	92	96	89	191	185	125	125	126

**\*Lectina UEA-1**

	Sitio anatómico				Epitelio		Detalle celular		
	duodeno	íleon	ciego	colon	revestimiento	cripta	Célula caliciforme	Ap. Golgi	Glucocálix
<b>Media</b>	2,35 <sup>a</sup>	2,36 <sup>a</sup>	2,08 <sup>a</sup>	2,19 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a</sup>	1,98 <sup>b</sup>	1,99 <sup>a</sup>	1,73 <sup>b</sup>	3,00 <sup>c</sup>
<b>ds</b>	1,21	1,15	1,03	0,72	0,90	1,13	0,96	1,22	0
<b>n</b>	84	84	90	78	171	165	112	112	112

**\*Lectina Con A**

	Sitio anatómico				Epitelio		Detalle celular		
	duodeno	íleon	ciego	colon	revestimiento	cripta	Célula caliciforme	Ap. Golgi	Glucocálix
<b>Media</b>	1,50 <sup>a</sup>	1,53 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>	0,83 <sup>b</sup>	1,58 <sup>a</sup>	1,12 <sup>b</sup>	0,09 <sup>a</sup>	1,44 <sup>b</sup>	2,52 <sup>c</sup>
<b>ds</b>	1,51	1,51	1,19	1,22	1,38	1,37	0,29	1,25	1,10
<b>n</b>	90	90	89	96	183	182	121	122	122

**\*Lectina WGA-1**

	Sitio anatómico				Epitelio		Detalle celular		
	duodeno	íleon	ciego	colon	revestimiento	cripta	Célula caliciforme	Ap. Golgi	Glucocálix
<b>Media</b>	1,90 <sup>a</sup>	1,88 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	1,64 <sup>b</sup>	2,14 <sup>a</sup>	1,58 <sup>b</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,59 <sup>b</sup>	2,98 <sup>c</sup>
<b>ds</b>	1,20	1,20	0,82	1,12	0,92	1,19	0	1,23	0,18
<b>n</b>	90	90	90	84	177	177	118	118	118

- Media**: valor promedio indicador de grado de reactividad frente a cada lectina
- Las medias**, dentro de la misma hilera, con distintas letras (a,b,c) son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ).
- ds**: desvío estándar
- n**: número de observaciones realizadas.

## **◆ DISCUSION**

Los carbohidratos se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos animales y su presencia se asocia a diversos procesos biológicos celulares. La estructura de los carbohidratos es compleja, más que la de las proteínas o los ácidos nucleicos. Pueden existir bajo diversas formas, como carbohidratos puros, glucoproteínas o glucolípidos. En los dos últimos, los polímeros complejos de glúcidos, actúan como señales que determinan la localización intracelular o el destino metabólico de los glucoconjugados. Diferentes tipos celulares pueden expresar diversas estructuras carbohidratadas (21, 69).

Mediante la utilización de las técnicas de lectinhistoquímica se ha avanzado en el conocimiento de la síntesis, distribución, almacenamiento y transformación de los glucoconjugados celulares. Dado que las lectinas reconocen azúcares específicos, pueden utilizarse para analizar, a un nivel general, los residuos de azúcares expuestos en la superficie de las membranas celulares. Diversos investigadores han utilizado las lectinas a fin de detectar variaciones en la expresión de los glucoconjugados en algunos procesos patológicos, principalmente inflamatorios y neoplásicos (21, 89).

En este trabajo se procedió al estudio lectinhistoquímico del tracto gastrointestinal de los ratones intoxicados con micotoxina T-2 con el objetivo de conocer si el daño estructural detectado con microscopio óptico y microscopio electrónico estuvo acompañado de modificaciones en los carbohidratos celulares. Al realizar el estudio estadístico, seleccionando cuatro lectinas con capacidad de reconocer distintos monosacáridos, se comprobó que no hubo diferencias entre los grupos T y C. A partir de estos resultados fue evidente que la acción citotóxica de la

micotoxina T-2 no provocó modificaciones en el patrón de distribución de los residuos hidrocarbonados celulares.

En la fisiología intestinal normal los enterocitos son los responsables de la digestión final de los nutrientes y de la absorción de agua y electrolitos. Estas células sintetizan las glucoproteínas que constituyen el glucocálix. Así, el glucocálix, participa en los procesos celulares de pinocitosis, transporte de enzimas digestivas y procesos de adhesión y reconocimiento celulares. Por otro lado, las células caliciformes presentes en las criptas y en el epitelio de superficie, son las encargadas de producir y secretar glucoproteínas con funciones de lubricación y protección físico-química del intestino (4, 57).

El hecho que, en nuestro trabajo, no haya habido diferencias en la afinidad por las distintas lectinas entre los grupos T y C, probablemente se deba a que las células epiteliales de revestimiento y las células caliciformes, principales secretoras de glucoconjugados, prácticamente no sufrieron daño morfológico que se tradujera en modificaciones funcionales.

La diferente reactividad en los distintos **tramos intestinales** frente a las lectinas **RCA-1, WGA y Con A** indica una variación del contenido carbohidratado y de la composición del glucocálix entre un sitio anatómico y otro. En la mayoría de los casos no existe una explicación obvia de estos cambios regionales, pudiendo ser el resultado de la diferenciación celular y la diversidad de la función intestinal.

La respuesta de las **células epiteliales** frente a la incubación con las cuatro lectinas se evidenció por una mayor intensidad de tinción en las células epiteliales de revestimiento que en las de las criptas. Esto se observó tanto en la superficie celular

correspondiente al **glucocálix** como en la región supranuclear del **complejo de Golgi**. Igual tendencia se ha encontrado en el epitelio intestinal de biopsias obtenidas del humano (28) y en muestras de intestino delgado provenientes de cerdos (8). En el caso del polo apical de las células (**glucocálix**), esta variación en la intensidad de la reacción indica que existen diferencias marcadas en la composición del mucus entre las células del compartimiento proliferativo (criptas) y las células del epitelio de revestimiento. La menor intensidad observada en las células de las criptas probablemente se asocia al grado de maduración celular. Estas células son morfológicamente inmaduras, poseen un ribete en cepillo poco desarrollado y toda su estructura intracelular recuerda a una célula secretora más que a una célula con función de absorción (4). Es probable que, en esta fase de inmadurez, el glucocálix que recubre la superficie celular sea menos rico en algunos de los oligosacáridos que se unen a las proteínas sintetizadas por las células. Si, en cambio, tomamos como ejemplo la respuesta del enterocito diferenciado frente a la lectina **WGA**, con capacidad de unirse a residuos GlcNac y ácido siálico, llama la atención la mayor reactividad observada. De este modo podría suponerse que durante el proceso madurativo, los carbohidratos asociados a la superficie celular se modifican sumando, en este caso, algunos azúcares terminales (como NeuAc) mediante un proceso catalizado por enzimas fijadas a las membranas.

Al considerar la reactividad del área correspondiente al **complejo de Golgi** frente a las lectinas, se observó que fue mayor en las células de la superficie de la vellosidad que en el fondo de las criptas. El complejo de Golgi tiene una función importante en las reacciones de glucosilación necesarias para la biosíntesis de las

glucoproteínas. Este proceso es complejo y en él actúan un gran número de enzimas que presentan ubicaciones diferenciales en las cisternas de Golgi (89). Estudios ultraestructurales realizados con las lectinas **WGA** y **Con A** han demostrado que el complejo de Golgi está compuesto, al menos, de dos subcompartimentos. Aquellos detectados con **Con A** resultaron ricos en oligosacáridos inmaduros y los identificados con **WGA**, en oligosacáridos maduros (144). En nuestro trabajo, al igual que con el glucocálix celular, las variaciones en la intensidad de la reacción observadas en el complejo de Golgi estarían directamente relacionadas con el proceso de maduración del enterocito. En este caso, la diferenciación de las células de la cripta intestinal hacia la célula madura se acompaña por cambios significativos en los niveles de muchas de las enzimas que intervienen en el proceso de glucosilación (92).

El análisis de la reactividad de las células caliciformes frente a las lectinas estudiadas reveló una muy débil o casi ausente respuesta ante las lectinas **Con A** (grado 0,09) y **RCA-1** (grado 0,72), mientras que la respuesta fue débil a moderada con las lectinas **WGA** (grado 1) y **UEA-1** (grado 1,73). A excepción de la respuesta negativa frente a la lectina **Con A**, coincidente con las observaciones realizadas por otros autores (8, 27, 28, 52, 54, 58), el resto de los resultados concuerdan parcialmente con estudios realizados utilizando las mismas lectinas en porcinos (8, 54) y ratones (58). Incluso, se ha observado que existen variaciones en la afinidad tintorial de las células caliciformes por igual lectina en diferentes líneas de ratones (58). En el caso de la lectina **Con A**, esta reconoce a la hexosa manosa (Man) y a la hexosamina N-acetilglucosamina (GlcNAc). La lectina **RCA-1**, por otro lado, reconoce a la hexosa galactosa (Gal) y a la hexosamina N-acetilgalactosamina (GalNAc). En la conformación



de las glucoproteínas, estos monosacáridos se encuentran formando parte de los enlaces O y N-glucosídicos con las cadenas polipeptídicas. En general, las N-acetilhexosaminas están en el extremo de las cadenas de oligosacáridos más próximos a la proteína y pueden quedar enmascaradas por los ácidos siálicos que, con frecuencia, se encuentran en los sitios terminales de la cadena (83). Algunos autores han observado que la baja reactividad de las células caliciformes frente a algunas lectinas (**PNA** o **GSA-II** -*Griffonia simplicifolia II*) parece deberse a que, a la glucoproteína que reacciona con esa lectina, se le suma algún otro azúcar terminal que enmascara el sitio de unión específico. Esto hace que las gotas de mucina no resulten reactivas. En el caso de la lectina **PNA** se ha comprobado que la remoción enzimática del ácido siálico terminal de la glucoproteína, expone residuos de galactosamina (GalN) y favorece que la mucina de la célula caliciforme reaccione con esta lectina (21). En nuestro trabajo no se realizó ningún tratamiento enzimático previo a la incubación con las lectinas. Esto podría explicar la baja reactividad de las células caliciformes frente a las lectinas mencionadas.

Los resultados obtenidos y discutidos permiten inferir que, a partir de los datos obtenidos en el estudio lectinhistoquímico, pudo haberse realizado una evaluación estadística más profunda y detallada. El hecho de, en un primer análisis general, no haber hallado diferencias en la presencia y localización de los residuos hidrocarbonados entre los grupos T y C nos condujo a limitar la extensión de la evaluación estadística. De este modo, en la presente discusión, sólo se esbozaron algunas ideas que permitieran relacionar la afinidad por determinada lectina con su posible significación en la biología de las células intestinales normales. En la mayoría

de los trabajos aquí citados se ha utilizado la lectinhistoquímica como único método para caracterizar poblaciones celulares normales, en procesos de diferenciación o francamente lesionadas. La variabilidad encontrada en los resultados nos lleva a considerar la dificultad de extraer conclusiones generales utilizando esta técnica como única herramienta. Estudios lectinhistoquímicos combinados con otros métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos probablemente ayuden al mejor entendimiento de los distintos procesos patológicos producidos por la micomicotoxina T-2.

### **◆CONCLUSIONES**

\*Mediante el estudio lectinhistoquímico se comprobó que no hubo diferencias entre los animales control y los inoculados con micotoxina T-2 en el patrón de afinidad del intestino por las lectinas RCA-1, Con A, WGA y UEA-1.

\*La técnica de lectinhistoquímica no resultó útil para obtener información que ayude a un mejor entendimiento de las lesiones intestinales causadas por la micotoxina T-2.

### **SECCION III**

#### **ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO**

**\*Objetivo específico:** Detectar la micotoxina T-2 en cortes de tejidos.

#### **A) INMUNOMARCACIÓN DE MICOTOXINA T-2 EN CORTES DE TEJIDOS**

##### **◆ MATERIALES Y METODOS**

(ver **Sección I:** animales, micotoxina y diseño experimental. Páginas 24 y 25).

**\*Procedimiento:** Se utilizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de los órganos del tracto gastrointestinal (estómago, duodeno, íleon, colon y ciego), del hígado y del riñón de los ratones de los **Grupos T y C (8, 16, 24 y 48 HPA)**, los que se desparafinaron y rehidrataron mediante pasajes por xilol y etanol en concentraciones decrecientes. En esta etapa, una serie de cortes fueron sometidos a la técnica de recuperación antigénica utilizando horno microondas (41). Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena incubando los cortes con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3 % en metanol absoluto, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. A fin de reducir la tinción inespecífica de fondo, las muestras se cubrieron con suero normal de conejo, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Los cortes se incubaron con un suero primario de conejo anti-micotoxina T-2 marcado con biotina (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA), en diluciones 1:50 a 1:400, durante 12 horas, a 4 °C. A continuación, se adicionó una solución del complejo ABC, durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Se utilizó DAB como cromógeno y

hematoxilina como coloración de contraste. Se realizaron controles negativos omitiéndose colocar el suero primario.

#### **◆ RESULTADOS**

El estudio inmunohistoquímico resultó negativo en todos los casos, no observándose células con precipitado pardo-negruzco indicativo de micotoxina T-2.

En aquellos casos en que los órganos presentaban células francamente necróticas se observó coloración parduzca que se interpretó como tinción inespecífica.

#### **◆ DISCUSION**

La utilización de técnicas inmunoquímicas para la detección de micotoxinas y sus metabolitos en tejidos corporales, fluidos y, principalmente, alimentos resulta útil para arribar al diagnóstico final en un cuadro presuntivo de micotoxicosis (14, 104). En los últimos años se han utilizado técnicas de inmunohistoquímica a fin de identificar la micotoxina T-2 en cortes histológicos de órganos provenientes de animales intoxicados experimentalmente (14, 67, 116).

En nuestro trabajo, el estudio inmunohistoquímico realizado sobre cortes de tejidos, arrojó resultados negativos. Esto no coincide con lo observado por Lee y col (67) quienes, mediante la técnica de inmunoperoxidasa PAP, identificaron micotoxina T-2 en esófago, estómago, duodeno, yeyuno y riñón entre los 5 minutos y las 6 horas posteriores a la exposición a la toxina.

Los resultados negativos presentes en nuestro trabajo podrían explicarse

teniendo en cuenta la especificidad del anticuerpo utilizado y el metabolismo de la micotoxina T-2.

En relación al anticuerpo utilizado, se ha observado que el antisuero anti-T-2 obtenido por inmunización de conejos es capaz de detectar un mínimo de 0,1 ng de T-2/ml mediante la prueba de ELISA (13, 67), mientras que los anticuerpos monoclonales antimicotoxina T-2 tuvieron una sensibilidad de 50 ng/ml por la misma prueba (42, 50). Sobre esta base, la elección de un antisuero desarrollado en conejo pareció la más adecuada para el estudio inmunohistoquímico ya que este suero reconoce tanto la micotoxina T-2 como las toxinas HT-2 e Iso T-2.

Otro de los factores que pudo haber influido en los resultados obtenidos es el metabolismo de la micotoxina T-2. Los datos experimentales sugieren que posteriormente a la incorporación de la toxina, la biotransformación y la eliminación de metabolitos ocurren poco después de la administración, sin llegar a acumularse en los tejidos (33, 82). La toxina HT-2, capaz de ser detectada por el antisuero utilizado en este trabajo, es uno de los metabolitos biológicamente activos que han sido recuperados en bilis, luego de la rápida metabolización de la micotoxina T-2 en ratas (15) y en tejidos de cerdos (159). Lee y col. (67) encontraron inmunomarcación positiva en los órganos antes mencionados, dentro de las 6 horas de administrada la toxina. En nuestro trabajo, el primer muestreo de órganos se realizó a las 8 horas posteriores a la inoculación de la micotoxina. Si bien en este periodo, aun la micotoxina T-2 y sus metabolitos están presentes en los tejidos y fluidos corporales, su concentración disminuye drásticamente (15, 82). Quizá esta haya sido la causa principal de los resultados negativos obtenidos. Por otro lado, la escasa información encontrada

referente a la aplicación de técnicas de inmunohistoquímica en la detección de micotoxinas hace pensar en las dificultades y limitaciones de utilizar estas técnicas como herramientas para la confirmación de una micotoxicosis.

## **B) INMUNOMARCACION DE CELULAS APOPTOTICAS EN ORGANOS DE RATONES INOCULADOS CON MICOMICOTOXINA T-2**

### **◆ MATERIALES Y METODOS**

#### **-Método TUNEL (TdT-mediated dUTP-nick end labeling)(detección *in situ* de ADN fragmentado)**

Se utilizaron cortes de 4  $\mu\text{m}$  de los órganos del tracto gastrointestinal (estómago, duodeno, íleon, colon y ciego) de los ratones de los **Grupos T y C (8, 16, 24 y 48 HPA)**. Se aplicó un equipo comercial de reactivos para la detección de apoptosis (ApopTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit, Oncor, Gaithersburg, MD). El método se basa en la marcación de los nucleosomas, resultantes de la fragmentación del ADN durante la apoptosis, con nucleótidos de digoxigenina-dUTP. Esta reacción es catalizada por la enzima deoxinucleotidiltransferasa (TdT). Luego, se realiza la incubación con un anticuerpo antidigoxigenina conjugado con peroxidasa. Los núcleos apoptóticos se visualizan mediante la reacción peroxidasa/DAB. En nuestro trabajo, se utilizó verde de metilo como tinción de contraste. Por otro lado, se realizaron controles negativos omitiéndose colocar la solución enzimática.

### **-Estudio histopatológico**

Los cortes de **estómago** se estudiaron mediante la observación de cinco cortes por ratón. En cada corte se eligieron, al azar, 5 campos microscópicos (objetivo 20x). En cada campo se contó el número de células epiteliales apoptóticas en las unidades cimogénicas (istmo, cuello y base).

Los cortes de **intestino** se estudiaron mediante la observación de cinco cortes por ratón. En cada corte se eligieron 10 criptas al azar (objetivo 20x). En cada cripta se contó el número de células epiteliales apoptóticas

### **-Cálculo de la tasa de apoptosis**

La tasa de apoptosis (TA), en cada corte, se calculó del siguiente modo:

$$\frac{\text{Nº de células apoptóticas}}{\text{Nº de células totales}} \times 100$$

A partir de estos porcentajes individuales se calcularon la media y el desvío estándar de los siete ratones de cada tiempo experimental, de los **Grupos T y C**. De este modo se obtuvo la TA de cada órgano. La evaluación estadística se realizó mediante la prueba t de Student (138,139).

## **◆ RESULTADOS**

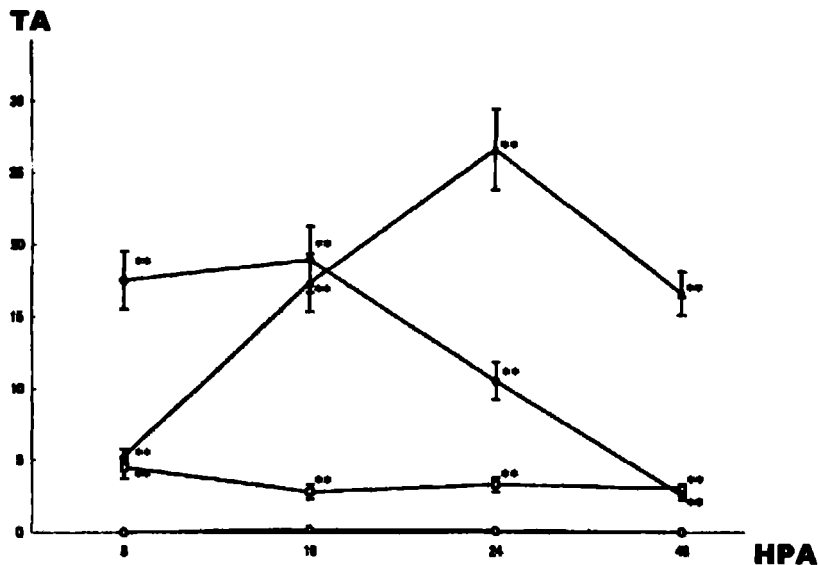
Con la aplicación del método TUNEL se observó una intensa coloración pardo-negrizca en los núcleos y fragmentos nucleares de la mayoría de las células que, en los cortes teñidos con H y E, se consideraron como núcleos picnóticos (Fig. 39 y 40).

**-Estómago:** en los animales del **Grupo T**, en la región del **istmo**, la TA fue de alrededor del 18%, a las **8 y 16 HPA**, observándose un marcado descenso a las **48**

HPA ( $2,5 \pm 0,3\%$ ). En la región del **cuello**, la TA fue menor al 5% durante todo el periodo experimental. En la **base**, la TA aumentó a partir de las **8 HPA** (alrededor del 5%) alcanzando un pico a las **24 HPA** ( $26,5 \pm 2,8\%$ ) y descendiendo a las **48 HPA** ( $16,5 \pm 1,5\%$ ).

En los animales pertenecientes al **Grupo C** la TA fue cercana al 0% en todas las regiones (Fig. 37).

**\*Figura 37: Tasa de apoptosis en las criptas intestinales de ratones control y tratados con micotoxina T-2**



\*TA: tasa de apoptosis; \*HPA: horas posinoculación;

\*Grupo T: ♦: istmo; □: cuello; ▲: base; Grupo C: ○

\*\*P<0,01: diferencias significativas

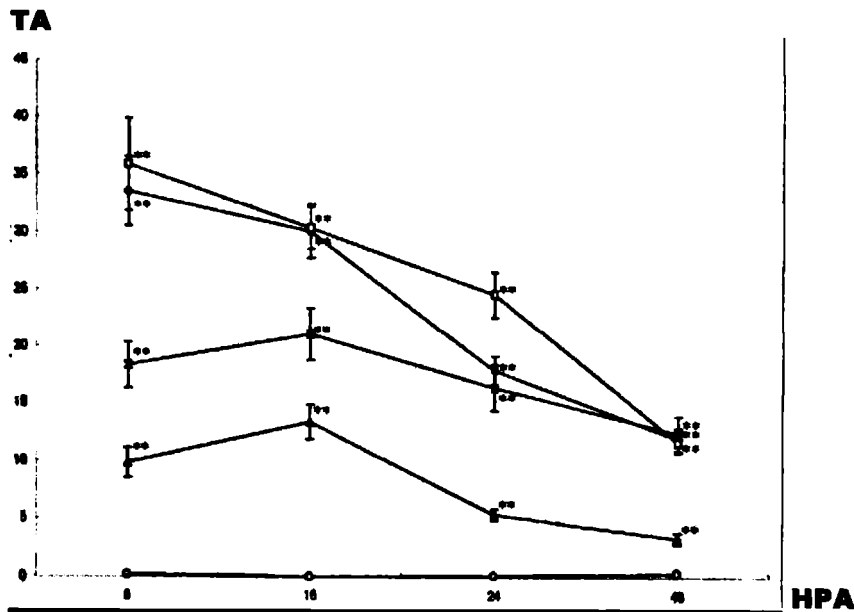
**-Intestino:** la TA en el **duodeno** y en el **íleon** fue mayor a las **8 HPA** ( $33,5 \pm 4,3\%$  y  $35,8 \pm 4\%$ , respectivamente) descendiendo hasta alcanzar, a las **48 HPA**, un valor del



12%. En el colon, la TA ascendió entre las 8 y las 16 HPA (18,3±2% y 21±2,3%, respectivamente) y luego descendió, a las 48 HPA, hasta un valor del 12,3±1,5%. Igual tendencia se observó en el ciego, con valores para la TA, de 9,8±1,3% (8 HPA), 13,3±1,5% (16 HPA) y 3,3±0,5% (48 HPA).

En los animales pertenecientes al Grupo C la TA fue cercana al 0% en todas las regiones (Fig. 38).

**\*Figura 38: Tasa de apoptosis en el epitelio del estómago de ratones control y tratados con micotoxina T-2**



\*TA: tasa de apoptosis; \*HPA: horas posinoculación;

\*Grupo T: ◆: duodeno; □: íleon; ▲: ciego; x: colon; Grupo C: ○

\*\*P<0,01: diferencias significativas

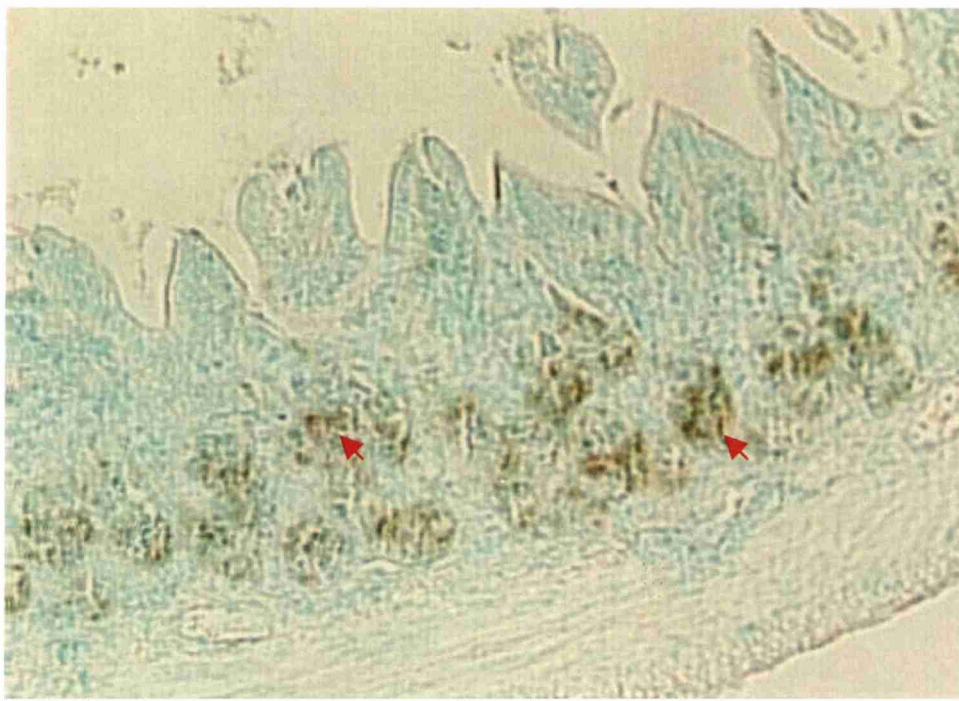
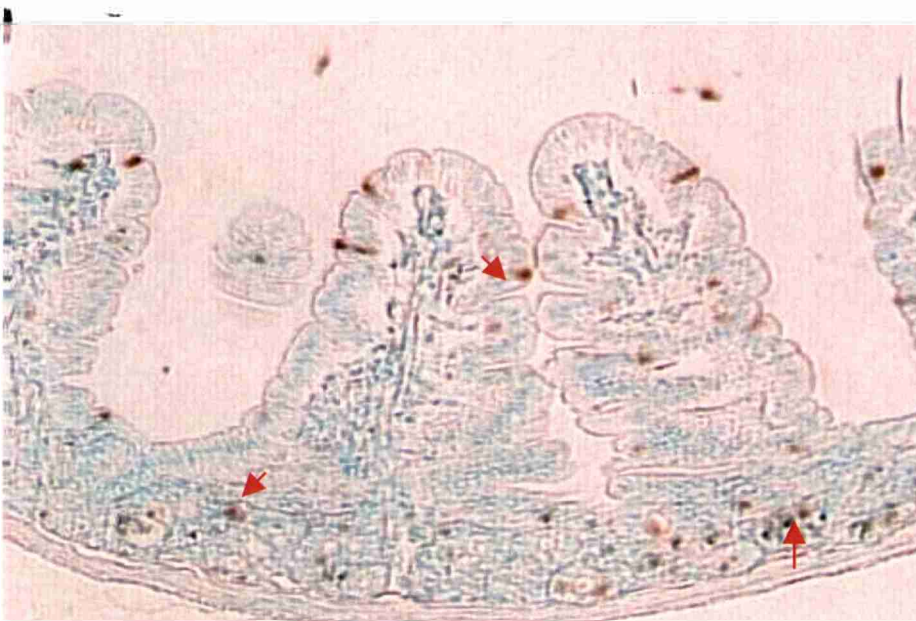
---

**\*Figura 39: Ileon de ratón tratado con micotoxina T-2, 16 HPA.**

Intensa coloración pardo oscura en núcleos y fragmentos nucleares (→) de las células epiteliales de las criptas intestinales. ApopTag/Verde de metilo, objetivo 20x.

**\*Figura 40: Duodeno de ratón tratado con micotoxina T-2, 16 HPA.**

Intensa coloración pardo oscura en núcleos y fragmentos nucleares (→) de las células epiteliales de las criptas intestinales y de la superficie de la vellosidad. ApopTag/Verde de metilo, objetivo 20x.

**Figura 39****Figura 40**

## **◆DISCUSION**

En nuestro trabajo se utilizó el método TUNEL a fin de identificar células epiteliales apoptóticas y conocer la tasa de apoptosis en el epitelio de los órganos del tracto gastro-intestinal. Los resultados obtenidos evidenciaron que la mayoría de las células con núcleo picnótico, observadas con H y E, resultaron positivas con el método TUNEL. La tasa de apoptosis varió según el órgano estudiado y el tiempo transcurrido desde la inoculación. En este sentido, los resultados se corresponden con los obtenidos previamente en nuestro estudio con microscopio óptico de los cortes teñidos con H y E (ver pág. 31 y 32). Por otro lado, en la intoxicación por micotoxina T-2, la apoptosis ha sido señalada como uno de los mecanismos de daño celular observado en los órganos linfopoyéticos y del tracto gastrointestinal (70, 71, 114, 117, 133, 134, 160). En nuestro trabajo, la dosis tóxica utilizada fue suficiente para causar apoptosis principalmente en las células con capacidad de división de estómago e intestino. Sólo en algunos ratones se observaron necrosis y descamación del epitelio de revestimiento de estos órganos con marcados cambios vasculares. La aplicación del método TUNEL demostró que la apoptosis fue la principal forma de muerte celular en los órganos del tracto gastrointestinal afectados por la micotoxina T-2.

Los mecanismos que conducen a una célula a la apoptosis aún no se conocen completamente. La fragmentación nucleosomal del ADN parece estar relacionada con un aumento del calcio citosólico que favorece la activación de endonucleasas. Además, en algunas células, la apoptosis dependería de la síntesis de ARNm y de una serie de proteínas en respuesta a una variedad de estímulos que actúan como inductores o inhibidores en este proceso (19, 25, 151). Se ha sugerido también que, en algunas

situaciones, la apoptosis podría ser mediada por metabolitos reactivos derivados del oxígeno (7, 140). Por otro lado, ciertas similitudes encontradas entre la apoptosis y el ciclo celular, han conducido a pensar que existe una conexión entre apoptosis y mitosis, en la que jugarían un papel fundamental varios genes. Se ha observado que algunos de los genes que normalmente intervienen en la regulación de la proliferación celular (genes c-myc, P-53) pueden inducir tanto proliferación como apoptosis (19, 140, 151). La “decisión celular” de seguir uno u otro camino estaría regulada por otros genes que originarían una segunda señal (140, 151). Si bien es evidente que la apoptosis es el resultado de la activación de diversos mecanismos, en la apoptosis inducida por citotoxinas se ha observado que algunas de ellas alteran determinadas fases del ciclo celular normal y la célula muere antes de llegar a la fase de mitosis. En contraste, algunas toxinas parecen actuar independientemente del ciclo celular (25).

En nuestro trabajo, los resultados demostraron que, junto con un aumento en la tasa de apoptosis del tracto gastrointestinal, hubo una disminución en el porcentaje de mitosis. En la actualidad se desconoce la relación que pueda existir entre la apoptosis inducida por T-2 y el ciclo celular. Si bien se ha demostrado que esta micotoxina inhibe la síntesis de proteínas y de ADN aún no se conoce el mecanismo de este efecto inhibitorio (123, 157).

## **◆CONCLUSIONES**

\*El estudio inmunohistoquímico realizado sobre cortes de tejidos a fin de identificar la micotoxina T-2 arrojó resultados negativos.

\*El estudio inmunohistoquímico realizado sobre cortes de órganos del tracto gastrointestinal a fin de identificar células apoptóticas demostró que la apoptosis fue la principal forma de muerte celular en estos órganos.

## **◆ CONCLUSIONES GENERALES**

\*La micotoxina T-2 causó alteraciones morfológicas celulares y subcelulares en estómago, intestino delgado y grueso, páncreas, hígado, timo, linfonódulo mesentérico y bazo.

\*Las lesiones principales observadas consistieron en:

-necrosis de las células epiteliales de las glándulas fúndicas del estómago y de las criptas del intestino y reducción del porcentaje de mitosis.

-necrosis, apoptosis y disminución en el número de células linfoides del timo, linfonódulo mesentérico, bazo y placas de Peyer.

-necrosis individual de las células parenquimatosas del hígado y páncreas.

\*Dentro de los órganos del sistema digestivo, el duodeno y el íleon fueron los más afectados. El mayor daño se observó a las 8 y 16 HPA. A partir de las 24 HPA se evidenció una tendencia a la recuperación de las lesiones.

\*Dentro de los órganos del sistema hematopoyético, el timo resultó el órgano más severamente dañado. La necrosis linfocitaria alcanzó valores máximos a las 16 y 24 HPA, comprometiendo, en mayor grado, a los linfocitos corticales. En este órgano las lesiones persistieron durante todo el período experimental.

\*En todos los órganos estudiados, excepto en el timo, se observó una recuperación de las lesiones casi completa al final del período experimental.

\*Mediante el estudio lectinhistoquímico se comprobó que no hubo diferencias entre los animales control y los inoculados con micotoxina T-2 en el patrón de afinidad del intestino por las lectinas RCA-1, Con A, WGA y UEA-1.

**\*La técnica de lectinohistoquímica no resultó útil para obtener información que ayude a un mejor entendimiento de las lesiones intestinales causadas por la micotoxina T-2.**

**\*El estudio inmunohistoquímico realizado sobre cortes de tejidos a fin de identificar la micotoxina T-2 arrojó resultados negativos.**

**\*El estudio inmunohistoquímico realizado sobre cortes de órganos del tracto gastrointestinal a fin de identificar células apoptóticas demostró que la apoptosis fue la principal forma de muerte celular en estos órganos.**



**◆ BIBLIOGRAFIA**

1. AHMED, N.; RAM, G.C. (1986) Nuclear lipid peroxidation induced in rat liver by T-2 mycotoxin. *Toxicon* 24: 947-949.
2. ANILKUMAR, T.V.; SARRAF, C.E.; HUNT, T.; ALISON, M.R. (1992) The nature of cytotoxic drug-induced cell death in murine intestinal crypts. *Br. J. Cancer* 65: 552-558.
3. AZIZ, N.H.; ELAZIZ, A.M.A.; OMRAN, R.M.A. (1995) Effects of T-2 mycotoxin on histopathological changes in rabbits. *Biomed. Letters* 51: 271-281.
4. BARKER, I.K.; VAN DREUMEL, A.A.; PALMER, N. (1993) The alimentary system. En: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer N. (eds.): *Pathology of domestic animals*. 4th. Ed., Academic Press Inc., San Diego, California, Vol. 2, Chapter 1: 1-318.
5. BERRY, C.L. (1988) The pathology of mycotoxins. Review article. *J. Path.* 154: 301-311.
6. BRATICH, P.M.; BUCK, W.B.; HASCHECK, W.M. (1990) Prevention of T-2 toxin-induced morphologic effects in the rat by highly activated charcoal. *Arch. Toxicol.* 64: 251-253.

7. BUTTKE, T.M.; SANDSTROM, P.A. (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today* 15: 7-10.
8. CHAE, CH.; LEE, Y-S (1995) Age-related lectin histochemical changes in the porcine small intestine. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 883-889.
9. CHAN, P. K-C; GENTRY, P.A. (1984) LD<sub>50</sub> values and serum biochemical changes induced by T-2 toxin in rats and rabbits. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73: 402-410.
10. CHANG, I-M; MAR, W-C (1988) Effect of T-2 toxin on lipid peroxidation in rats: elevation of conjugated diene formation. *Toxicology Letters* 40: 275-280.
11. CHI, M.S.; MIROCHA, C.J.; KURTZ, H.J.; WEAVER, G.; BATES, F.; SHIMODA, W.; BURMEISTER, H.R. (1977a) Acute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks and laying hens. *Poultry Sci.* 56: 103-116.
12. CHI, M.S.; MIROCHA, C.J.; KURTZ, H.J.; WEAVER, G.; BATES, F.; SHIMODA, W. (1977b) Subacute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks. *Poultry Sci.* 56: 306-313.
13. CHU, F.S.; GROSSMAN, R.; WEI, -D.; MIROCHA, C.J. (1979) Production

- of antibody against T-2 toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 104-108.
14. CHU, F.S. (1986) Immunochemical methods for diagnosis of mycotoxicoses. En: Richard, J.L.; Thurston, J.R. (eds.): *Diagnosis of mycotoxicoses*. Martinus Nijhoff Publishers, Ames, Iowa, 163-176.
  15. CODDINGTON, K.A.; SWANSON, S.P.; HASSAN, A.S.; BUCK, W.B. (1989) Enterohepatic circulation of T-2 toxin metabolites in the rat. *Drug Metabolism and Disposition* 17: 600-605.
  16. COHEN, J.J. (1993) Apoptosis. *Immunology Today*. 14: 126-130.
  17. COLE, R.J.; COX, R.H. (1981a) The trichothecenes. En: *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, Inc., New York, 152- 263.
  18. COLE, R.J.; COX, R.H. (1981b) *Fusarium* toxins. En: *Handbook of toxic fungal metabolites*. Academic Press, Inc., New York, 893-910.
  19. CORCORAN, G.B.; FIX, L.; JONES, D.P.; MOSLEN, M.T.; NOCOTERA, P.; OBERHAMMER, F.A.; BUTTYAN, R. (1994) Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 128: 169-181.
  20. CORRIER, D.E.; ZIPRIN, R.L. (1987) Immunotoxic effects of T-2 mycotoxin

- on cell-mediated resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *Vet. Immunol. Immunopath.* 14: 11-21.
21. DAMJANOV, Y. (1987) Biology of disease. Lectin cytochemistry and histochemistry. *Lab. Inv.* 57: 5-20.
  22. DE NICOLA, D.B.; REBAR, A.H.; CARLTON, W.W. (1978) T-2 toxin mycotoxicosis in the guinea-pig. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 16: 601-609.
  23. DIEKMAN, M.A.; GREEN, M.L. (1992) Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J. Anim. Sci.* 70: 1615-1627.
  24. DUVALL, E.; WYLLIE, A.H. (1986) Death and the cell. *Immunology Today* 7: 115-119.
  25. EASTMAN, A. (1993) Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 121: 160-164.
  26. FAIFER, G.C.; ZABALO, O.; GODOY, H.M. (1992) Further studies on the hematopoietic damage produced by a single dose of T-2 toxin in mice. *Toxicology* 75: 169-174.
  27. FALK, P.; ROTH, K.A.; GORDON J.I. (1994) Lectins are sensitive tools for

defining the differentiation programs of mouse gut epithelial cell lineages. *Am. J. Physiol.* 266 (Gastrointest. Liver Physiol. 29): G987- G1003.

28. FISHER, J. (1983) Histochemical and biochemical characterization of glycoprotein components in normal gastric mucosa, intestinal metaplasia and gastric cancers with lectins. En: Bøg-Hansen, T.C.; Spengler, G.A. (eds.). *Lectins: biology, biochemistry and clinical biochemistry.* Vol.3: 167-178.
29. FORSELL, J.H.; KATELEY, J.R.; YOSHIZAWA, T.; PESTKA, J.J. (1985) Inhibition of mitogen-induced blastogenesis in human lymphocytes by T-2 toxin and its metabolites. *Appl. Environm. Microbiol.* 49: 1523-1526.
30. FREEMAN, B.A.; CRAPO, J.D. (1982) Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab. Inv.* 47: 412-426.
31. FRIEND, S.C.E.; BABIUK, L.A.; SCHIEFER, H.B. (1983) The effects of dietary T-2 toxin on the immunological function and Herpes simplex reactivation in Swiss mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 69: 234-244.
32. GALTIER, P.; PAULIN, F.; EECKHOUTTE, C.; LARRIEU, G. (1989) Comparative effects of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol on drug metabolizing enzymes in rat tissues. *Fd. Chem, Toxic.* 27: 215-220.

33. GALTIER , P. (1998) Biological fate of mycotoxins in animals. *Revue Méd. Vét.* 149: 549-554.
34. GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y.; BEN-SASSON, S.A. (1992) Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119: 494-501.
35. GHADIALLY, F.N. (1988a) Nucleus. En: F.N. Ghadially (ed.): *Ultrastructural pathology of the cell and matrix.* 3th. ed., Butterworths, London, vol. 1: 1-180.
36. GHADIALLY, F.N. (1988b) Mitochondria. En: F.N. Ghadially (ed.): *Ultrastructural pathology of the cell and matrix.* 3th. ed., Butterworths, London, vol. 1: 191-328.
37. GHADIALLY, F.N. (1988c) Cytoplasmic matrix and its inclusions. En: F.N. Ghadially (ed.): *Ultrastructural pathology of the cell and matrix.* 3th. ed., Butterworths, England, vol. 2: 953-1041.
38. GIMENO E.J., MASSONE A.R., MARINO F.P., IDIART J.R. (1995) Intermediate filament expression and lectin histochemical features of canine transmissible venereal tumour. *APMIS* 103: 645-650.

39. GLAVITS, R.; VANYI, A. (1988) Effect of trichothecene mycotoxins (satratoxin H and T-2 toxin) on the lymphoid organs of mice. *Acta Vet. Hungarica* 36: 37-41.
40. GOLD, R.; SCHMIED, M.; GIEGERICH, G.; BREITSCHOPF, H.; HARTUNG, H.P.; TOYKA, K.V.; LASSMANN, H. (1994) Differentiation between cellular apoptosis and necrosis by the combined use of *in situ* tailing and nick translation techniques. *Lab. Inv.* 71: 219-225.
41. GOWN, A.M.; de WEBER, N.; BATTIFORA, H. (1993) Microwave-based antigen unmasking. A revolutionary new technique for routine immunohistochemistry. *Appl. Immunohistochemistry* 1: 256-266.
42. HACK, R.; MÄRTLBAUER, E.; TERPLAN, G. (1987) A monoclonal antibody to the trichothecene T-2 toxin: screening for the antibody by a direct enzyme immunoassay. *J. Vet. Med. B* 34: 538-544.
43. HAYES, M.A.; BELLARY, E.C.; SCHIEFER, H.B. (1980a) Subacute toxicity of dietary T-2 toxin in mice: morphological and hematological effects. *Can. J. Comp. Med.* 44: 203-218.
44. HAYES, M.A.; SCHIEFER, H.B. (1980b) Subacute toxicity of dietary T-2 toxin in mice: influence of protein nutrition. *Can. J. Comp. Med.* 44: 219-228.

45. HESSELTINE, C.W. (1986) Resume and future needs in the diagnosis of mycotoxicoses. En: Richard, J.L.; Thurston, J.R. (eds.): Diagnosis of mycotoxicoses. Martinus Nijhoff Publishers, Iowa, 381-385.
46. HOERR, F.J.; CARLTON, W.W.; YAGEN, B. (1981) Mycotoxicosis caused by a single dose of T-2 toxin or diacetoxyscirpenol in broiler chickens. *Vet. Pathol.* 18: 652-664.
47. HOLDEN, C. (1982) Unequivocal evidence of soviet toxin use. *Science* 216: 154-155.
48. HOLT, P.S.; DELOACH, J.R. (1988) In vitro effect T-2 mycotoxin on the immune response of mice. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1480-1484.
49. HSU, I.C.; SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M.; RIBELIN, W.E. (1972) Identification of T-2 toxin in moldy corn associated with a lethal toxicosis in dairy cattle. *Appl. Microbiol.* 24: 684-690.
50. HUNTER, K.W.; BRIMFIELD, A.A.; MILLER, M.A.; FINKELMAN, F.D.; CHU, S.F. (1985) Preparation and characterization of monoclonal antibodies to the trichothecene mycotoxin T-2. *Appl. Env. Microbiol.* 49: 168-172.



51. ITAGAKI, S.; DOI, C.; MITSUOKA, T.; DOI, K. (1990) Histochemical study on the bile duct system of normal rats. *Exp. Anim.* 39: 421-424.
52. ITAGAKI, S.; PERFUMO, C.J.; PETRUCCELLI, M.A.; DOI K. (1994) Lectin histochemical changes of goblet cell mucin in rabbit mucoid enteropathy. *Lab. Anim. Sci.* 44: 82-84.
53. JACQUES, K. (1988) Molds: the hidden killer in feeds. *Norden News*, Autumn:22-29.
54. JAEGER, L.A.; LAMAR, C.H.; TUREK, J.J. (1989) Lectin binding to small intestinal goblet cells of newborn, suckling, and weaned pigs. *Am. J. Vet. Res.* 50: 1984-1987.
55. JOFFE, A. (1974) Toxicity of *Fusarium poae* and *F. sporotrichiodes* and its relation to alimentary aleukia. En: Purchase, I.F.H. (ed.): *Mycotoxins*. Els. Scient. Publish. Comp., Amsterdam, 229-262.
56. JUBB, K.V.F. (1993) The pancreas. En: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer N. (eds.): *Pathology of domestic animals*. 4<sup>th</sup> ed., Academic Press Inc., San Diego, California, Vol. 2, Chapter 3: 407-424.

57. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. (1981) *Histología básica*. Segunda edición en español. Salvat Eds., S.A., Barcelona.
58. KANDORI, H.; HIRAYAMA, K.; TAKEDA, M.; DOI, K. (1996) Histochemical, lectin-histochemical and morphometrical characteristics of intestinal goblet cells of germfree and conventional mice. *Exp. Anim.* 45: 155-160.
59. KARAM, S.; LEBLOND, C.P. (1995) Origin and migratory pathways of the eleven epithelial cell types present in the body of the mouse stomach. *Mic. Res. Tech.* 31: 193-214.
60. KELLY, R.W. (1993) The liver and biliary system. En: Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Palmer N. (eds.): *Pathology of domestic animals*. 4th ed., Academic Press Inc., San Diego, California, Vol. 2, Chapter 2: 319-406.
61. KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.
62. KOHNEN, P.; WEISS, L. (1964) An electron microscopic study of thymic corpuscles in the guinea pig and the mouse. *Anat. Rec.* 148: 29-57.

63. KOSURI, N.R.; SMALLEY, E.B.; NICHOLS, R.E. (1971) Toxicologic studies of *Fusarium tricinctum* (Corda) Snyder et Hansen from moldy corn. Am. J. Vet. Res. 32: 1843-1850.
64. KOTSONIS, F.N.; SMALLEY, E.B.; ELLISON, R.A.; GALE, C.M. (1975) Feed refusal factors in pure cultures of *Fusarium roseum* "graminearum". Appl. Microbiol. 30: 362-368.
65. KURTZ, H. (1986) Comparative pathologic changes in trichothecene toxicosis. En: Richard, J.L.; Thurston, J.R. (eds.): Diagnosis of mycotoxicoses. Martinus Nijhoff Publishers, Ames, Iowa, USA, 191-194.
66. LEATHEM, A.J.C.; ATKINS, N.J. (1983) Lectin binding to paraffin sections. En: Bullock, G.R.; Patrusz, P. (eds.): Techniques in immunocytochemistry. Academic Press Inc. London. Vol 2: 39-70.
67. LEE, S.C.; BEERY, J.T.; CHU, F.S. (1984) Immunoperoxidase localization of T-2 toxin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 72: 228-235.
68. LEESON, S.; DIAZ, G.; SUMMERS, J.D. (1995) Trichothecenes. En: Leeson, S.; Diaz, G.; Summers, J.D. (eds.): Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books, Guelph, Ontario, Chapter 12: 190-226.

69. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. (1993) Glúcidos. En: Principios de Bioquímica. 2da. Ed. Omega, S.A., Barcelona. Capítulo 11: 298-321.
70. LI, G.M.; SHINOZUKA, J.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. (1997a) T-2 toxin-induced apoptosis in Peyer's patches of mice. *J. Toxicol. Pathol.* 10: 59-61.
71. LI, G.M.; SHINOZUKA, J.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. (1997b) T-2 toxin-induced apoptosis in intestinal crypt epithelial cells of mice. *Exp. Toxicol. Pathol.* 49: 447-450.
72. LI, J.; SHIMIZU, T.; MIYOSHI, N.; YASUDA, N. (1997a) Rapid apoptotic changes in the gastric glandular epithelium of rats administered intraperitoneally with *Fusarenon-x*. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 17-22.
73. LI, J.; SHIMIZU, T. (1997b) Course of apoptotic changes in the rat gastric mucosa caused by oral administration of *Fusarenon-x*. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 191-199.
74. LORI, G.A.; ALIPPI, H.E.; LUCIA, G.E.; MARTIN, A.A. (1983) Efectos de la temperatura sobre la esporulación, el crecimiento micelial y la toxicidad de *Fusarium poae* (peck) Wollenweber. *Rev. Fac. Agr. de La Plata* 59: 133-140.

75. LORI, G.A.; LUCIA, G.E.; BANCHERO, E.; ALIPPI, H.E.; MARTIN, A.A. (1984) Estudio de las especies del género *Fusarium* en Argentina. I: Estudio micológico en muestras de alimentos y toxicogénico de *F. graminearum* y *F. poae*. Rev. Med. Vet. 65: 26-33.
76. LORI, G. A. (1985) Género *Fusarium* en la Argentina. II: Identificación de especies que afectan cultivos en la zona de La Plata. Rev. Arg. Microb. 17: 61-67.
77. LUCIA, G.E; MARTIN, A.A.; LORI, G.A.; ALIPPI, H.E. (1984) Sensibilidad de la piel de conejo a extractos de cultivo de *Fusarium poae* (peck) Wollenweber. Rev. Arg. Microb. 16: 27-32.
78. MANN, P.L. (1988) Membrane oligosaccharides: structure and function during differentiation. Int. Rev. Cytol. 112: 67-96.
79. MARASAS, W.F.O.; BAMBURG, J.R.; SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M.; RAGLAND, W.L.; DEGURSE, P.E. (1969) Toxic effects on trout, rats and mice of T-2 toxin produced by the fungus *Fusarium tricinctum* (Cd.) Snyder et Hans. Toxicol. Appl. Pharmacol. 15: 471-482.
80. MARRS, T.C.; EDGINTON, J.A.G.; PRICE, P.N.; UPSHALL, D.G. (1986)

- Acute toxicity of T-2 mycotoxin to the guinea-pig by inhalation and subcutaneous routes. *Br. J. Exp. Pathol.* 67: 259-268.
81. MASSONE, A.R.; ITAGAKI, S.; DOI, K.; GIMENO E.J. (1991) Lectin histochemical study on normal and paratuberculosis-affected bovine ileum. *J. Vet. Med. Sci.* 53: 761-763.
82. MATSUMOTO, H.; ITO, T.; UENO, Y. (1978) Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. XII: Fate and distribution of T-2 toxin in mice. *Japan. J. Exp. Med.* 48: 393-399.
83. MAYES, P.A. (1997) Carbohidratos de importancia fisiológica. En: Gamboa, A.L. (ed.). *Bioquímica de Harper*. 14ta edición en español. Ed. El Manual Moderno, México D.F. Capítulo 15: 165-176.
84. MIROCHA, C.J. (1983) Effect of trichothecene mycotoxins on farm animals. En: Ueno, Y. (ed.): *Trichothecenes: Chemical, biological and toxicological aspects*. Kodansha Ltd., Tokyo, 177-194.
85. MOLLENHAUER, H.H.; CORRIER, D.E.; DROLESKEY, R.E. (1989) Ultrastructural lesions induced by T-2 toxin in mice. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 21:611-617.

86. MORE, J.; GALTIER, P.; EECKHOUTTE, C. (1990) Effect of low doses of a trichothecene mycotoxin (diacetoxyscirpenol) on rat gastric glycoproteins: a histochemical study. *Toxicol. Letters* 50: 173-178.
87. MOREAU, C. (1979) Troubles nerveux et digestifs liés à la consommation par les animaux, d'aliments contaminés par des *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*. *Revue de Mycologie* 43: 227-238.
88. MOREAU, C. (1984) Vingt ans de mycotoxines en France. Les dossiers de l'élevage 5: 5-20.
89. MURRAY, R.K. (1997) Glucoproteínas. En: Gamboa, A.L. (ed.). *Bioquímica de Harper*. 14ta edición en español. Ed. El Manual Moderno, México D.F. Capítulo 56: 761-782.
90. NI, Y.; TIZARD, Y. (1996) Lectin-carbohydrate in the immune system. *Vet. Immunol. Immunopath.* 55: 205-223.
91. NIYO, K.A.; RICHARD, J.L.; NIYO, Y.; TIFFANY, L.H. (1988) Effects of T-2 mycotoxin ingestion on phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by rabbit alveolar macrophages and on hematologic serum biochemical, and pathologic changes in rabbits. *Am. J. Vet. Res.* 49: 1766-1773.

92. OPDENAKKER, G.; RUDD, P.M.; PONTING, C.P.; DWEK, R.A. (1993) Concepts and principles of glycobiology *The FASEB Journal* 7: 1330-1337.
93. OSWALD, I.P.; COMERA, C. (1998) Immunotoxicity of mycotoxins. *Revue Méd. Vét.* 149: 585-590.
94. OSWEILER, G.D. (1986) Occurrence and clinical manifestations of trichothecene toxicoses and zearalenone toxicoses. En: Richard, J.L.; Thurston, J.R. (eds.): *Diagnosis of mycotoxicoses*. Martinus Nijhoff Publishers, Ames, Iowa, 31-42.
95. OSWEILER, G.D. (1992) Mycotoxins. En: Leman, A.D.; Straw, B.E.; Mengeling, W.L.; D'Allaire, S.D.; Taylor, D.J. (eds.): *Disease of swine*. 7th. Ed., Iowa State University Press, Ames, IOWA, 735-743.
96. PACE, J.G. (1983) Effect of T-2 mycotoxin on rat liver mitochondria electron transport system. *Toxicon* 21: 675-680.
97. PACE, J.G.; WATTS, M.R. (1989) Hepatic subcellular distribution of [<sup>3</sup>H]T-2 toxin. *Toxicon* 27: 1307-1311.
98. PALTI, J. (1978) *Toxigenic Fusaria, their distribution and significance as*



- cause of disease in animal and man. *Acta Phytomedica; Supplements to J. Phytopath.*: 1- 110.
99. PANG, V.F.; ADAMS, J.H.; BEASLEY, V.R.; BUCK, W.B.; HASCHEK, W.M. (1986) Myocardial and pancreatic lesions induced by T-2 toxin, a trichothecene mycotoxin, in swine. *Vet. Pathol.* 23: 312-319.
100. PANG, V.F.; SWANSON, S.P.; BEASLEY, V.R.; BUCK, W.B.; HASCHEK, W.M. (1987) The toxicity of T-2 toxin in swine following topical application: clinical signs, pathology and residue concentrations. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9: 41-49.
101. PANG, V.F.; LAMBERT, R.J.; FELSBURG, P.J.; BEASLEY, V.R.; BUCK, W.B.; HASCHEK, W.M. (1988) Experimental T-2 toxicosis in swine following inhalation exposure: clinical signs and effects on hematology, serum biochemistry and immune response. *Fundam. Appl. Toxicol* 11: 100-109.
102. PAOLICCHI, F.A.; CIPOLLA, A.L.; CASARO, A.P.; MASSONE, A.R.; ITAGAKI, S.; GIMENO, E.J. (1995) Lectin histochemical study on the reproductive tract in normal and *Brucella ovis*-infected rams. *J. Vet. Med. Sci.* 57: 935-938.
103. PARENT-MASSIN, D.; THOUVENOT, D. (1995) In vitro toxicity of trichotecenes on rat haematopoietic progenitors. *Food. Addit. Contam.* 12: 41-49.

104. PARK, J.J.; CHU, F.S. (1996) Assessment of immunochemical methods for the analysis of trichothecene mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *J. AOAC Int.* 79: 465-471.
105. PATHRE, S.V.; MIROCHA, C.J. (1977) Assay methods for trichothecenes and review of their natural occurrence. En: Rodricks, J.V.; Hesseltine, C.W.; Mehlman, M.A. (eds.): *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publisher Inc., Park Forest South, Illinois, 229-253.
106. PERFUMO, C.J.; ITAGAKI, S.; PETRUCCELLI, M.A.; GODOY, H.M.; IDIART, J.R.; QUIROGA, M.A.; DOI, K. (1991) Pathology of acute experimental T-2 intoxication in pigs: light, electron microscopic and lectin histochemical studies. En: *Abstracts of XXIV World Veterinary Congress, Río de Janeiro: P6.14 (255p.)*.
107. PERFUMO, C.J.; MORES N., ARMOCIDA A.D.; PIFFER I.A.; MASSONE A.R.; ITAGAKI S. (1998) Histochemical and lectin histochemical studies on nasal mucosa of pigs with or without respiratory diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 1021-1023.
108. PIER, A.C. (1973) An overview of the mycotoxicoses of domestic animals.

J.A.V.M.A. 163: 1259-1261.

109. PIER, A.C.; RICHARD, J.L.; CYSEWSKI, S.J. (1980) Implications of mycotoxins in animal disease. JAVMA 176:719-724.
  
110. PITTET, A. (1998) Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds. An updated review. Revue Méd. Vét. 149: 479-492.
  
111. PRELUSKY, D.B.; HAMILTON, R.M.G.; FOSTER, B.C.; LOCKSLEY TRENHOLM, H.; THOMPSON, B.K. (1987) Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70: 1049-1055.
  
112. PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B.; SOBIN, L.H. (eds.) (1995) Métodos histotecnológicos. Edición en castellano. Publicado por el Registro de Patología de los EUA (ARP), Washington, D.C.
  
113. QUIROGA, M.A.; DOI, C.; HAN, J-S.; DOI, K.; AKAI, H.; TAMURA, K. (1991) Acute hepatotoxicity of T-2 toxin in mice. J. Toxicol. Pathol. 4: 35-44.
  
114. QUIROGA, M.A.; ITAGAKI, S.; DOI, K. (1993) Early ultrastructural changes of thymocytes in T-2 toxicated mice. J. Toxicol. Pathol. 6: 109-112.

115. QUIROGA, M.A.; MASSONE, A.R.; PERFUMO, C.J.; ARMOCIDA, A.D.; AGUIRRE, J.I.; IDIART, J.R. (1996a) Neumonía enzoótica porcina. Estudio lectinhistoquímico comparativo de pulmones normales y afectados. Arch. Med. Vet. 28: 129-135.
116. QUIROGA, M.A.; PERFUMO, C.J. (1996b) Efectos de las micotoxinas producidas por especies de hongos del género *Fusarium* en cerdos. Rev. Med. Vet. 77: 322-326.
117. QUIROGA, M.A.; RISSO, M.A.; PERFUMO, C.J.; IDIART, J.R.; OHTSUKA, R.; DOI, K. (2000) Sequence of and regional difference in apoptotic index in the mouse gastrointestinal mucous epithelia after T-2 toxin inoculation. J. Toxicol. Pathol. 13: 193-196.
118. RHODIN, J.A.G. (1974) Thymus. En: J.A.G. Rhodin (ed.): Histology. A text and atlas. London. 417-424.
119. RICHARD, J. L.; THURSTON, J.R.; PIER, A.C. (1979) Laboratory diagnosis of mycotoxicosis of veterinary importance in the United States. Proceedings of the 83rd Annual Meeting of the United States Animal Health Association, San Diego, California. 205-225.
120. RIZZO, A.F.; ATROSHI, F.; AHOTUPA, M.; SANKARI, S.; ELOVAARA, E.

- (1994) Protective effect of antioxidants against free radical-mediated lipid peroxidation induced by DON or T-2 toxin. *J. Vet. Med. A* 41: 81-90.
121. ROITT, I.M.; BROSTOFF, J.; MALE D.K. (1986) El sistema linfoide. En: Roitt, Brostoff, Male (eds.): *Inmunología*. Ed. en español. Gower Medical Publishing Ltd., Barcelona, España 3: 3.1-3.10.
122. ROSEN, R.T. y ROSEN, J.D. (1982) Presence of four *Fusarium* mycotoxins and synthetic materials in "Yellow Rain" *Biomed. Mass. Spectr.* 9: 443-450.
123. ROSENSTEIN, Y.; LAFARGE, F.C. (1983) Inhibitory effect of *Fusarium* T-2 toxin on lymphoid DNA and protein synthesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 70: 283-288.
124. SAITO, M.; OHTSUBO, K. (1974) Trichothecene toxins of *Fusarium* species. En: Purchase, I.F.H. (ed.): *Mycotoxins*. Els. Scient. Publish. Comp., Amsterdam, 263-281.
125. SATO, N.; UENO, Y.; ENOMOTO, M. (1975) Toxicological approaches to the toxic metabolites of *Fusaria*. VIII- Acute and subacute toxicities of T-2 toxin in cats. *Japan. J. Pharmacol.* 25: 263-270.

126. SATO, N.; UENO, Y. (1977) Comparative toxicities of trichothecenes. En: Rodricks, J.V.; Hesseltine, C.W.; Mehlman, M.A. (eds.): *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publisher Inc., Park Forest South, Illinois, 295-307.
127. SATO, N.; ITO, T.; KUMADA, H.; UENO, Y.; ASANO, K.; SAITO, M.; OHTSUBO, K.; UENO, Y.; HATANAKA, Y. (1978) Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. XIII- Hematological changes in mice by a single and repeated administrations of trichothecenes. *J. Toxicol. Sci.* 3: 335-356.
128. SATO, S. (1986) Comparative biochemical changes associated with the trichothecenes toxicoses. En: Richard, J.L.; Thurston, J.R. (eds.): *Diagnosis of mycotoxicoses*. Martinus Nijhoff Publishers, Ames, Iowa, 113-123.
129. SAUER, D.B. (1988) Effects of fungal deterioration on grain: nutritional value, toxicity and germination. *Int. J. Food Microbiol.* 7: 267-275.
130. SCHIEFER, H.B.; HANCOCK, D.S. (1984) Systemic effects of topical application of T-2 toxin in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 76: 464-472.
131. SCHIEFER, H.B.; HANCOCK, D.S.; BHATTI, A.R. (1986) Systemic effects of topically applied trichothecenes. I: Comparative study of various

- trichothecenes in mice. *J. Vet. Med. A* 33: 373-383.
132. SCHWARTZ, L.M.; OSBORNE, B.A. (1993) Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunology Today* 14: 582-590.
133. SHINOZUKA, J.; GUANMIN, L; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. (1997) Process of the development of T-2 toxin-induced apoptosis in the lymphoid organs in mice. *Exp. Anim.* 46: 117-126.
134. SHINOZUKA J.; SUZUKI, M.; NOGUCHI, N.; SUGIMOTO, T.; UETSUKA, K.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. (1998) T-2 toxin-induced apoptosis in hematopoietic tissues of mice. *Toxicol. Pathol.* 26: 674-681.
135. SHLOSBERG, A.S.; KLINGER, Y.; MALKINSON, M.H. (1986) Muscovy ducklings, a particularly sensitive avian bioassay for T-2 toxin and diacetoxyscirpenol. *Avian Dis.* 30: 820-824.
136. SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M. (1974) Toxic trichothecenes. En: Purchase, I.F.H. (ed.): *Mycotoxins*. Els. Scient. Publish. Comp., Amsterdam, 199-228.
137. SMITH, T.K. (1992) Recent advances in the understanding of *Fusarium* trichothecene mycotoxicoses. *J. Anim. Sci.* 70: 3989-3993.

138. SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. (1984) *Introducción a la bioestadística*. Editorial Reverté S.A., Barcelona.
139. STEEL, R.G.; TORRIE, F.J. (1980) *Principles and procedures of statistics: a biometrical approach*. 2nd Ed., McGraw-Hill Company, New York.
140. STELLER, H. (1995) Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267: 1445-1449.
141. STEYN, P.S. (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol. Let.* 82/83: 843-851.
142. SUNEJA, S.K.; WAGLE, D.S.; RAM, G.C. (1989) Effect of oral administration of T-2 toxin on glutathione shuttle enzymes, microsomal reductases and lipid peroxidation in rat liver. *Toxicon* 27: 995-1001.
143. SZILÁGYI, M.; FEKETE, S.; HUSZENICZA, GY.; ALBERT, M. (1994) Biochemical and physiological effects of long-term sublethal T-2 toxin feeding in rabbits. *Acta Biologica Hungarica* 45: 69-76.
144. TARTAKOFF, A.M.; VASSALLI, P. (1983) Lectin-binding sites as markers of Golgi subcompartments: proximal-to-distal maturation of oligosaccharides. *The*



Journal of Cell Biology 97:1243-1248.

145. TERAO, K.; UENO, Y. (1978) Morphological and functional damage to cells and tissues. En: Uraguchi, K.; Yamazake, M. (eds.): Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins. Kodansha Ltd., Tokyo, 189-238.
146. TERAO, K. (1983) The target organella of trichothecenes in rodents and poultry. En: Ueno, Y. (ed.): Trichothecenes: Chemical, biological and toxicological aspects. Kodansha Ltd., Tokyo, 147-162.
147. THOMPSON, C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267: 1456-1462.
148. THURMAN, J.D.; CREASIA, D.A.; TROTTER, R.W. (1988) Mycotoxicosis caused by aerosolized T-2 toxin administered to female mice. Am. J. Vet. Res. 49: 1928-1931.
149. TRUSAL, L.R.; O'BRIEN, J.C. (1986) Ultrastructural effects of T-2 mycotoxin on rat hepatocytes *in vitro*. Toxicon 24: 481-488.
150. TSUCHIDA, M.; MIURA, T.; SHIMIZU, T.; AIBARA, K. (1984) Elevation of thiobarbituric acid values in the rat liver intoxicated by T-2 toxin. Biochem. Med. 31: 147-166.

151. UEDA, N.; SHAH S.V. (1994) Apoptosis. *J. Lab. Clin. Med.* 124: 169-177.
152. UENO, Y.; ISHIKAWA, K.; AMAKAI, K.; NAKAJIMA, M.; SAITO, M.; ENOMOTO, M.; OHTSUBO, K. (1970) Comparative study on skin-necrotizing effect of scirpene metabolites of *Fusaria*. *Japan J. Exp. Med.* 40: 33-38.
153. UENO, Y.; ISHIKAWA, Y.; NAKAJIMA, M.; SAKAI, K.; ISHII, K.; TSUNODA, H.; SAITO, M.; ENOMOTO, M.; OHTSUBO, K.; UMEDA, M. (1971) Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. I. Screening of toxic strains. *Japan J. Exp. Med.* 41: 257-272.
154. UENO, Y.; ISHII, K.; SAKAI, K.; KANAEDA, S.; TSUNODA, H.; TANAKA, T.; ENOMOTO, M. (1972) Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. IV- Microbial survey on "bean-hulls poisoning of horses" with the isolation of toxic trichothecenes, neosolaniol and T-2 toxin of *Fusarium solani M-1-1*. *Japan J. Exp. Med.* 42: 187-203.
155. UENO, Y.; ISHII, K.; SATO, N.; OHTSUBO, K. (1974) Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*. VI- Vomiting factor from moldy corn infected with *Fusarium spp.* *Japan J. Exp. Med.* 44: 123-127.
156. UENO, Y. (1977a) Trichothecenes: Overview address. En: Rodricks, J.V.;

- Hesseltine, C.W. y Mehlman, M.A. (eds.): *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publisher Inc., Park Forest South, Illinois, 189-207.
157. UENO, Y. (1977b) Mode of action of trichothecenes. *Ann. Nutr. Alim.* 31: 885-900.
158. UENO, Y. (1986) Toxicology of microbial toxins. *Pure Appl. Chem.* 58: 339-350.
159. UENO, Y. (1988) Toxicology of trichothecene mycotoxins. *Isi Atlas of Science: Pharmacology*, 121-124.
160. UENO, Y.; UMEMORI, K.; NIIMI, E.; TANUMA, S.; NAGATA, S.; SUGAMATA, M.; IHARA, T.; SEKIJIMA, M.; KAWAI, K.; UENO, Y.; TASHIRO, F. (1995) Induction of apoptosis by T-2 toxin and other natural toxins in HL-60 human promyelotic leukemia cells. *Natural toxins* 3: 129-137.
161. VANYI, A.; GLAVITS, R.; GAJDACS, E.; SANDOR, G.; KOVACS, F. (1991) Changes induced in newborn piglets by the trichothecene toxin T-2. *Acta Veterinaria Hungarica* 31: 29-37.
162. VENTURINI, M.C.; QUIROGA, M.A.; RISSO, M.A.; DI LORENZO, C.;

- OMATA, Y.; VENTURINI, L.; GODOY, H. (1996) Mycotoxin T-2 and aflatoxin B<sub>1</sub> as immunosuppressors in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Comp. Path.* 115: 229-237.
163. VICENTE, A.; VARAS, A.; SACEDON, R.; ZAPATA, A.G. (1996) Histogenesis of the epithelial component of rat thymus: an ultrastructural and immunohistological analysis. *Anat. Rec.* 244: 506-519.
164. WEAVER, G.A.; KURTZ, H.J.; BATES, F.Y.; CHI, M.S.; MIROCHA, C.J.; BEHRENS, J.C.; ROBISON, T.S. (1978) Acute and chronic toxicity of T-2 mycotoxin in swine. *Vet. Rec.* 103: 531-535.
165. WIJSMAN, J.H.; JONKER, R.R.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C.J.H.; CORNELISSE, C.J.; VAN DIERENDONCK, J.H. (1993) A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end-labeling of fragmented DNA. *J. Histochem. Cytochem.* 41: 7-12.
166. WYATT, R.D.; WEEKS, B.A.; HAMILTON, P.B.; BURMEISTER, H.R. (1972) Severe oral lesions in chickens caused by ingestion of dietary fusariotoxin T-2. *Appl. Microbiol.* 24: 251-257.
167. WYATT, R.D.; HAMILTON, P.B.; BURMEISTER, H.R. (1973) The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poultry Sci.* 52: 1853-1859.

168. YOSHIZAWA, J. (1983) Toxicoses: natural occurrence and control. En: Ueno, Y. (ed.): Trichothecenes: Chemical, biological and toxicological aspects. Kodansha Ltd., Tokyo, 195-209.



29024

P-1

110

*Donación*

FEB 08, 2003