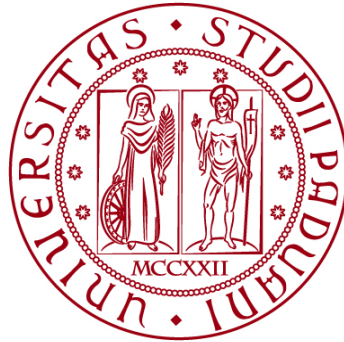


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**METODOLOGIE IN VITRO PER LO STUDIO DELLA
TOSSICITÀ DELLE MICOTOSSINE EMERGENTI**

Tutor: Prof.ssa Mery Giantin
Dipartimento Biomedicina Comparata e Alimentazione

Laureando: Amedeo Iacoboni

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

Sommario

Abstract.....	5
Introduzione.....	6
1. Enniatine (ENNs).....	6
1.1. Analisi chimica e strutturale.....	6
1.2. Proprietà biochimiche.....	7
1.3. Tossicocinetica e Tossicodinamica.....	7
1.3.1. ROS.....	8
1.3.2. Alterazione ciclo cellulare.....	8
1.3.3. Apoptosi.....	8
1.3.4. Alterazione del potenziale di membrana mitocondriale.....	8
1.3.5. Attività estrogenica.....	9
1.3.6. Genotossicità.....	9
2. Beauvericina (BEA).....	9
2.1. Analisi chimica e strutturale.....	9
2.2. Proprietà biochimiche.....	10
2.3. Tossicocinetica e Tossicodinamica.....	10
2.3.1. ROS.....	10
2.3.2. Alterazione del ciclo cellulare.....	10
2.3.3. Apoptosi.....	11
2.3.4. Attività estrogenica.....	11
2.3.5. Genotossicità.....	11
3. Scopo.....	12
4. Materiali e metodi.....	12
4.1. Il profilo proteomico mitocondriale indica la fosforilazione ossidativa come bersaglio principale per la miscela di Beauvericina ed Enniatina B (Alonso-Garrido et al. 2020).....	12
4.1.1. Reagenti.....	12
4.1.2. Coltura cellulare ed esposizione alle micotossine.....	12
4.1.3. Estratti arricchiti di mitocondri.....	13
4.1.4. Preparazione del campione per la proteomica.....	13
4.1.5. Preparazione di estratti peptidici per la proteomica quantitativa.....	13
4.1.6. Spettrometria di massa label-free e analisi dei dati.....	13
4.1.7. Analisi funzionale delle proteine.....	14
4.2. Studi in silico e <i>in vitro</i> sulle micotossine e sui loro cocktail; la loro tossicità e mitigazione della tossicità mediante pretrattamento con silibinina (Tran et al. 2020).....	14
4.2.1. Reagenti e strumentazione.....	14

4.2.2.	Linee cellulari e colture cellulari.....	14
4.2.3.	Integratore alimentare a base di cardo mariano	15
4.2.4.	Saggio di citotossicità	15
4.2.5.	U-HPLC-MS Determinazione di micotossine e silibinina	15
4.2.6.	Effetto combinato delle micotossine nelle miscele binarie	15
4.2.7.	Saggio di genotossicità	16
5.	Risultati.....	16
5.1.	Il profilo proteomico mitocondriale indica la fosforilazione ossidativa come bersaglio principale per la miscela di Beauvericina ed Enniatina B (Alonso-Garrido et al. 2020).....	16
5.1.1.	Analisi proteomica delle cellule Jurkat esposte a BEA:ENN B.....	16
5.2.	Studi in silico e <i>in vitro</i> sulle micotossine e sui loro cocktail; La loro tossicità e mitigazione della tossicità mediante pretrattamento con silibinina (Tran et al. 2020)	17
5.2.1.	Tossicità acuta delle micotossine nelle miscele binarie.....	17
5.2.2.	Effetti protettivi della silibinina contro la genotossicità da micotossine..	17
6.	Discussione e conclusioni.....	18
7.	Bibliografia	19

Abstract

La contaminazione di alimenti e mangimi ad opera delle micotossine è un argomento ampiamente studiato e discusso. Infatti, sono molti gli articoli che trattano di indagini volte a studiare la presenza, la tossicità e le strategie che possono essere messe in atto per tutelare il consumatore finale, sia esso umano o animale, da possibili intossicazioni.

Tuttavia, la maggior parte di questi articoli trattano di micotossine “tradizionali”, quali aflatossine, zearalenone e tricoteceni, non tenendo in considerazione quelle che sono considerate micotossine emergenti come la beauvericina (BEA) e le enniatine (ENN).

Queste due micotossine, metaboliti secondari dei funghi del genere *Fusarium*, risultano infatti essere molto più presenti rispetto a quello che ci si aspettava e forse a causa del riconoscimento tardivo come micotossine sono state poco studiate.

L’obiettivo di questa tesi è di andare ad indagare le caratteristiche di queste micotossine, facendo riferimento a studi condotti *in vitro*.

Verranno studiate nel particolare le caratteristiche chimico-fisiche, biologiche e i meccanismi di azione di queste due molecole cercando di fornire un quadro più preciso di quello che potrebbe essere il loro meccanismo d’azione e il rischio per la salute animale e umana.

Introduzione

I funghi del genere *Fusarium* sono patogeni comuni nei cereali, nei mangimi e nei prodotti alimentari in tutto il mondo. In condizioni favorevoli il loro metabolismo secondario può produrre micotossine esadepsipeptidiche come le enniatine (ENN) e la beauvericina (BEA).

Le ENN si trovano comunemente in diversi cereali e nei loro prodotti derivati, nel pesce, nella frutta secca, nelle noci, nelle spezie, nel cacao e nei prodotti del caffè. È da considerare che processi alimentari, tra cui la cottura, non influiscono sulla loro struttura chimica; pertanto, le strategie di disintossicazione per mitigare i rischi della presenza di queste micotossine negli alimenti e nei mangimi possono essere difficilmente applicabili.

La BEA è stata trovata in campioni di avena, frumento, orzo e segale in concentrazioni che vanno da pochi $\mu\text{g}/\text{kg}$ a oltre mg/kg .

La natura lipofila di entrambe le molecole consente loro di essere incorporate nei doppi strati lipidici delle membrane cellulari e creare pori cationici selettivi che causano un aumento della permeabilità per i cationi, con conseguente disturbo del livello fisiologico di cationi nella cellula.

A differenza di altre micotossine prodotte dal genere *Fusarium*, come deossinivalenolo (DON), T-2, HT-2, fumonisine (FB) e zearalenone (ZEA), la cui presenza in alimenti e mangimi è stata regolamentata da autorità come l'EFSA¹, per queste due micotossine non sono stati ancora fissati dei limiti.

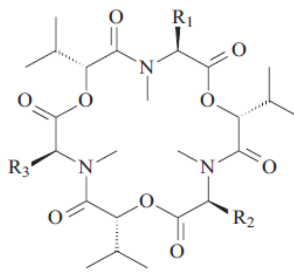
Tuttavia, un numero sempre crescente di studi sta dimostrando la loro presenza in diversi prodotti alimentari e mangimi, suscitando preoccupazione riguardo la loro tossicità sia come singole micotossine, sia in mix con altre in quanto la loro tossicità potrebbe essere potenziata (Prosperini et al. 2017) (Mallebrera et al. 2018)

1. Enniatine (ENNs)

1.1. Analisi chimica e strutturale

Strutturalmente le ENNs sono cicloesadepsipeptidi composti da residui alternati di tre amminoacidi N-metilici, comunemente valina, leucina e isoleucina, e tre idrossiacidi, tipicamente acido idrossiisovalerico (Figura 1). Sono stati identificati diversi analoghi di ENN (A, A1, B, B1, B2, B3, B4, D, E, F e G); tra questi, i più diffusi e segnalati come contaminanti naturali nei cereali in Europa sono ENN A, A1, B e B1.

¹ Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare



ENN	R1	R2	R3
A	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
A₁	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	CH(CH ₃) ₂
B	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂
B₁	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃) ₂	CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

Figura 1 Struttura chimica delle enniatine (ENNs) (Prosperini et al. 2017)

1.2. Proprietà biochimiche

Le ENN sono molecole dotate di proprietà ionoforiche, le quali permettono loro di trasportare cationi, sia mono che bivalenti, attraverso le membrane. Tale meccanismo di trasporto risulta particolarmente rilevante nell'espletarsi della tossicità in quanto causa un disequilibrio delle concentrazioni fisiologiche di cationi all'interno delle cellule, comportando l'interruzione delle normali funzioni cellulari.

La capacità di trasportare ioni da parte di ENN si basa su un meccanismo di trasporto selettivo per ioni K⁺ rispetto a ioni Na⁺, definito meccanismo a "sandwich", poiché coinvolge due molecole di ENN per ciascuno ione da trasportare.

L'attività ionoforica di ENN, inoltre, risulta connessa alle proprietà mitocondrio-tossiche di questa stessa molecola: è stato dimostrato, infatti, che il trasporto di K⁺ all'interno dei mitocondri di ratto ad opera di ENN riduce la capacità di ritenzione del calcio nella matrice mitocondriale, portando ad un collasso del potenziale di membrana (Prosperini et al. 2017).

1.3. Tossicocinetica e Tossicodinamica

Per quanto concerne la tossicità di ENN, sono disponibili pochi studi eseguiti in vivo ad eccezione di uno studio di tossicocinetica eseguito nel suino; in questo studio risulta una maggiore biodisponibilità di ENN B rispetto ad altre enniatine.

Da tali evidenze, si può evincere che l'ENN B sia il rappresentante con più elevato potenziale tossico della famiglia delle enniatine.

Inoltre, risulta particolarmente interessante notare che, dopo somministrazione intraperitoneale in topo, non sono stati osservati particolari effetti di tossicità acuta, sebbene si possa evidenziare bioaccumulo di ENN B nei tessuti lipofili (Rodríguez-Carrasco et al. 2016).

È stato anche dimostrato che ENN B inibisce l'attività dell'ACAT², un enzima intracellulare situato nel reticolo endoplasmatico che trasferisce i gruppi acilici grassi da una molecola all'altra e che viene sintetizzato all'interno dei mitocondri. Tale inibizione compromette il corretto funzionamento del ciclo di Krebs.

² Acetil Coenzima A Trasferasi

1.3.1. ROS

Le ENN sono responsabili all'interno della cellula dello stress ossidativo, il cui principale attore è rappresentato dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS). È da considerare, infatti, che la generazione intracellulare di ROS nel compartimento idrofobo di una cellula può indurre la perossidazione lipidica. La produzione di ROS è indotta da ENN B nelle cellule Caco-2³ a causa degli eventi citotossici causati nei mitocondri.

1.3.2. Alterazione ciclo cellulare

È stato dimostrato che le micotossine possono disturbare la normale distribuzione del ciclo cellulare a causa dei loro effetti antiproliferativi su diversi tipi cellulari, con accumulo di cellule in una o più fasi del ciclo cellulare. Juan-García et al. 2013 hanno osservato che in HepG2⁴ ENN B ha provocato una percentuale più alta di cellule arrestate in fase G0/G1 a 48 ore rispetto a ENN A. In generale, l'accumulo di cellule durante il ciclo cellulare in qualsiasi fase dopo un trattamento indica un'attività antiproliferativa del composto o dei composti utilizzati.

Nelle cellule Caco-2, come descritto da (Prosperini et al. 2017), ENN B ha indotto un arresto del ciclo cellulare in fase G2/M dopo 72 ore di esposizione con un aumento significativo del numero di cellule bloccate in questa fase rispetto al controllo. Sono stati osservati anche una diminuzione della popolazione di cellule in fase S e un aumento di cellule in fase SubG0/G1.

1.3.3. Apoptosi

È stato dimostrato che ENN B ha indotto l'apoptosi in diverse linee cellulari, sia da sola che in miscela con altre ENN, causando frammentazione nucleare e formazione di corpi apoptotici. In particolare, l'effetto apoptotico e la necrosi sono stati osservati nelle cellule Caco-2 dopo 48 ore di esposizione a ENN B.

(Juan-García et al. 2013) hanno scoperto che sia l'ENN B che l'ENN A hanno causato l'apoptosi nelle cellule HepG2 dopo 48 ore di esposizione, identificando ENN B come più tossico di ENN A, mentre non è stata osservata necrosi.

1.3.4. Alterazione del potenziale di membrana mitocondriale

I mitocondri sono stati riconosciuti per il loro ruolo nella mediazione dei processi fisiologici e per il loro coinvolgimento nella trasduzione del segnale. Sono inoltre coinvolti nella regolazione della proliferazione e differenziazione cellulare, così come nella regolazione della morte cellulare, cioè nei processi di necrosi e apoptosi. La morte cellulare indotta da apoptosi e necrosi da parte di agenti citotossici comporta disturbi metabolici e, soprattutto, transizione di permeabilità mitocondriale (MPT). Gli eventi mitocondriali di apoptosi e necrosi comportano l'apertura di un poro nella membrana mitocondriale interna, indicato come PTP mitocondriale (MPTP) e la conseguente dissipazione del potenziale di membrana. La dissipazione dell' MMP (potenziale di membrana mitocondriale) risulta dalla distribuzione ineguale degli ioni sulla membrana mitocondriale interna. La dissipazione di MMP è una caratteristica generale di entrambi i tipi di morte cellulare.

³ Caco-2 è una linea cellulare immortalizzata di cellule di adenocarcinoma coloretale umano. Viene utilizzato principalmente come modello della barriera epiteliale intestinale.

⁴ Le cellule Hep G2 sono cellule immortalizzate, e sono un sistema modello in vitro adatto per lo studio degli epatociti umani.

La distruzione di MMP è stata dimostrata nelle cellule Caco-2 e HepG2. L'esatto meccanismo con cui le micotossine pro-ossidanti inducono l'apertura dei pori non è ancora del tutto chiaro, ma è stato dimostrato che almeno due siti molecolari del complesso contribuiscono a questo effetto.

1.3.5. Attività estrogenica

Recentemente, Kalayou et al. 2015 hanno condotto un'indagine per valutare i possibili effetti di interferenza endocrina dell'ENN B dimostrando che nella linea cellulare di carcinoma adrenocorticale umano H295R, ENN B era in grado di ridurre la produzione di progesterone, testosterone e cortisolo a una concentrazione non citotossica. Concentrazioni più elevate ($>10 \mu\text{M}$) hanno ridotto sia i livelli di estradiolo sia di testosterone nelle cellule di Leydig.ente, Kalayou et al. hanno condotto un'indagine per valutare i possibili effetti di interferenza endocrina dell'ENN B dimostrando che nella linea cellulare di carcinoma adrenocorticale umano H295R, ENN B era in grado di ridurre la produzione di progesterone, testosterone e cortisolo a una concentrazione non citotossica. Concentrazioni più elevate ($>10 \mu\text{M}$) hanno ridotto sia i livelli di estradiolo che di testosterone nelle cellule di Leydig.

1.3.6. Genotossicità

La genotossicità sembra non essere coinvolta nell'induzione della morte cellulare da parte dell'ENN B. Come riportato da Föllmann, Behm, e Degen 2009, ENN B, nonostante il suo elevato potenziale citotossico, non ha indotto alcun danno al DNA: tali effetti sono stati valutati mediante il Comet assay alcalino⁵ nelle cellule Caco-2. Al contrario nelle cellule HEK 293T è stato dimostrato un effetto genotossico.

2. Beauvericina (BEA)

2.1. Analisi chimica e strutturale

BEA è un esadepsipeptide ciclico che contiene tre residui D-idrossi-isovalericili e tre residui N-metil-fenilalanilici in una sequenza alternata (Figura 2).

BEA appartiene alla famiglia delle enniatine ENN, anch'esse prodotte dalle specie *Fusarium*, ma differisce da ENN nella natura dell'acido N-metilammino.

L'assenza di gruppi caricabili nell'esapeptide ciclico spiega la scarsa solubilità in acqua e la bassa reattività chimica di BEA, anch'essa caratterizzata da un triplice asse di simmetria.

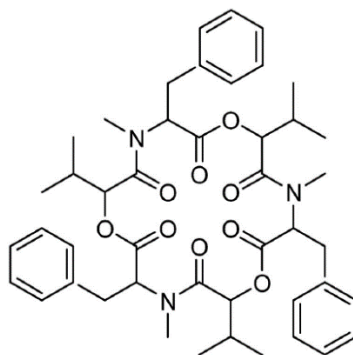


Figura 2 Struttura fisica della Beauvericina

⁵ Il Comet assay è un test di mutagenesi utilizzato per identificare danni al DNA in una cellula

2.2. Proprietà biochimiche

Anche BEA, come le ENN, è nota come ionoforo. Le proprietà ionoforiche hanno effetto sull'omeostasi cellulare e sono accompagnate dall'idrolisi e dall'acidificazione dell'ATP, che alla fine contribuisce alla morte cellulare.

Ci sono prove che BEA si incorpori nelle cellule di mammifero e nelle membrane sintetiche, formando un canale cationico selettivo andando a formare un complesso a struttura sandwich con cationi. Questi complessi di solito sono costituiti da un catione e uno ionoforo in rapporto 1:1, sebbene possano coinvolgere due o tre molecole di ionoforo. L'alterazione delle normali concentrazioni fisiologiche di importanti cationi monovalenti e bivalenti potrebbe essere la ragione della tossicità non specifica di BEA.

BEA aumenta la concentrazione di Ca^{2+} in modo dose-dipendente in alcune cellule testate *in vitro*. Agisce anche come disaccoppiatore mitocondriale, disturba il fisiologico equilibrio ionico e il pH, modifica il metabolismo cellulare e provoca deplezione di ATP e citolisi. (Kouri, Duchon, e Lemmens-Gruber 2005)

2.3. Tossicocinetica e Tossicodinamica

Sono stati condotti pochissimi studi sul comportamento tossicocinetico di BEA. Quello che si conosce è che la BEA rimane nella sua forma non metabolizzata in tutti i campioni analizzati degli studi disponibili ma a basse concentrazioni. Inoltre, si bioaccumula nei tessuti lipofili con concentrazioni nei campioni biologici 18 volte superiori a quelle rilevate per l'ENN B. Il valore più alto di BEA è stato riscontrato nel fegato, che è il principale organo detossificante. Uno studio condotto da Mei et al. (2009), riporta che BEA è un potente inibitore degli enzimi della superfamiglia del citocromo P450⁶ nei microsomi del fegato umano e di ratto.

2.3.1. ROS

In cellule Caco-2 esposte a BEA è stata riscontrata la generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e la perossidazione lipidica di membrana trovando una relazione tra la produzione di ROS e perossidazione lipidica di membrana. È stato ipotizzato che il danno cellulare prodotto da BEA possa coinvolgere anche lo stress ossidativo. (Prosperini et al., 2013).

2.3.2. Alterazione del ciclo cellulare

È stato dimostrato che BEA diminuisce la percentuale di cellule in fase G0/G1 e arresta il ciclo cellulare nelle fasi S e G2/M, in modo dipendente dal tempo sia nelle cellule Caco-2 che nelle cellule CHO-K1⁷ (Prosperini et al., 2013; Mallebrera et al., 2016). Al contrario, BEA diminuisce la percentuale di cellule nella fase Sub G0/G1 nella linea cellulare di retinoblastoma umano (Y79), mentre sono stati osservati cambiamenti significativi nelle altre fasi del ciclo cellulare.

L'arresto del ciclo cellulare è una condizione transitoria che può essere indotta da diversi fattori e, generalmente, le cellule regrediscono spontaneamente da questa

⁶ Il citocromo P450 è deputato all'eliminazione di sostanze endogene ed esogene

⁷ Linea cellulare epiteliale derivata dall'ovaio del criceto cinese utilizzata nella ricerca biologica

condizione ripristinando il loro tasso di proliferazione o diventando apoptotiche (o necrotiche).

2.3.3. Apoptosi

L'induzione della morte cellulare mediante apoptosi è stata confermata in diverse linee cellulari, come le cellule di glioma NSCL A549⁸, KB-3-1, Caco-2, CHO-K1, H4IIE e C6 (Lin et al., 2005; Prosperini et al., 2013; Mallebrera et al., 2015).

È stato dimostrato che BEA aumenta l'attività della caspasi-3, la quale ha un ruolo importante nella frammentazione del DNA e nei cambiamenti morfologici associati all'apoptosi. Ciò suggerisce che l'attivazione della caspasi-3 attraverso il rilascio del citocromo C dai mitocondri partecipi all'induzione dell'apoptosi nelle cellule. L'apoptosi indotta da BEA è controllata da un'espressione equilibrata tra le proteine pro-apoptotiche (come Bax, Bad e Bak) e anti-apoptotiche (come Bcl-2). L'apoptosi indotta da BEA nelle cellule NSCLC A549 è stata accompagnata da up-regulation di Bax, p-Bad e Bak e down-regulation di p-Bcl2. La famiglia di geni appartenente al pathway di Bcl-2 svolge un ruolo importante nel controllo dell'integrità mitocondriale; si suppone che alcune proteine Bcl-2 possano indurre o inibire il rilascio del citocromo c nel citosol che di conseguenza attiva la caspasi-9 e la caspasi-3, con conseguente apoptosi. Inoltre, la depolarizzazione transmembrana mitocondriale, caratterizzata da una diminuzione del potenziale di membrana mitocondriale, è stata osservata nelle cellule esposte a BEA (Lin et al., 2005; Prosperini et al., 2013; Mallebrera et al., 2015).

2.3.4. Attività estrogenica

BEA ha mostrato una forte attività antagonista a concentrazioni elevate (10 μ M) nei confronti dei recettori per estrogeno, androgeno, progestinici e glucocorticoidi.

È stato inoltre scoperto che BEA interferisce con la sintesi del progesterone nelle cellule del cumulo⁹ a causa della sovraespressione del CYP11A1 nei mitocondri, portando ad una meiosi anomala. BEA può interferire anche con l'attività di MDR1¹⁰ riducendo i livelli di ATP negli zigoti e può ridurre l'attività mitocondriale nei primi embrioni. (Mallebrera et al. 2018)

2.3.5. Genotossicità

La genotossicità è definita come un effetto distruttivo sul materiale genetico di una cellula (DNA, RNA) che ne pregiudica l'integrità. La frammentazione del DNA internucleosomiale, la condensazione cromosomica, il blebbing della membrana, il restringimento cellulare, la formazione del corpo apoptotico e i cambiamenti morfologici apoptotici sono stati osservati nelle cellule esposte a BEA in modo dipendente dal tempo (Lin et al., 2005).

Danni significativi al DNA sono stati rilevati dal Comet assay dopo 24 ore di esposizione a concentrazioni di BEA pari a 0,5, 1 e 12 μ M rispettivamente nelle cellule PK15, CHO-K1 e Caco-2 (Prosperini et al., 2013; Mallebrera et al., 2016).

⁸ Linea cellulare utilizzata per studiare l'elaborazione metabolica del tessuto polmonare e i possibili meccanismi di somministrazione di farmaci al tessuto

⁹ Strato di cellule del follicolo che circondano la cellula uovo in fase di maturazione

¹⁰ Glicoproteina di membrana con funzione di pompa la cui attività sembra essere quella di estrarre dal citoplasma sostanze penetrate nella cellula

3. Scopo

Una volta introdotte le caratteristiche generali delle enniatine e della beauvericina, lo scopo di questa tesi è quello di andare ad indagare, attraverso gli esperimenti condotti in vitro da Alonso-Garrido et al. 2020 e Tran et al. 2020, gli effetti cellulari di queste micotossine.

Il primo articolo è stato scelto in quanto pone l'attenzione sulla regolazione delle proteine coinvolte nel corretto funzionamento mitocondriale.

Il secondo articolo invece risulta particolarmente interessante perché si concentra sulla valutazione degli effetti riconducibili a mix di micotossine che contaminano lo stesso alimento.

4. Materiali e metodi

4.1. Il profilo proteomico mitocondriale indica la fosforilazione ossidativa come bersaglio principale per la miscela di Beauvericina ed Enniatina B (Alonso-Garrido et al. 2020)

Questo articolo si pone come obiettivo quello di analizzare tutti i possibili effetti dell'esposizione alle micotossine nei mitocondri utilizzando tecniche di proteomica. I progressi tecnici ottenuti grazie all'approccio con piattaforme -omiche hanno migliorato l'accuratezza delle misurazioni, lo studio della variazione intra-individuale intrinseca e l'interazione tra la normale fisiologia animale ed i percorsi di risposta allo stress.

4.1.1. Reagenti

Di seguito si riportano i reagenti utilizzati per le colture cellulari: terreno RPMI-glutamax, penicillina/streptomina, siero bovino fetale (FBS), soluzione salina tampone fosfato (PBS), BEA (783,95 g/mol, purezza 97%) e ENN B (783,95 g/mol, purezza 97%), acquistati presso Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Il dimetilsolfossido (DMSO) e il metanolo sono stati ottenuti da Fisher Scientific (Madrid, Spagna). L'acqua deionizzata (resistività <18 MV cm) è stata ottenuta utilizzando un sistema di purificazione dell'acqua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). BEA e ENN B (1 mg/ml) sono state preparate in metanolo e mantenute a -20 °C. Per ottenere le concentrazioni finali di micotossine sono state eseguite delle diluizioni nel mezzo di coltura. La concentrazione finale di DMSO nel mezzo è pari a 0,5% (v/v).

4.1.2. Coltura cellulare ed esposizione alle micotossine

Per la coltura cellulare sono state utilizzate cellule T Jurkat mantenute in terreno composto da: RPMI-glutamax integrato con 100 U/mL di penicillina, 100 mg/mL di streptomina e 10% (v/v) di FBS inattivato.

Le condizioni di incubazione delle colture sono state fissate ai seguenti valori: pH 7,4, 37 °C con 5% di CO₂ e umidità costante. Ogni due giorni è stato cambiato il terreno di coltura e per testare l'assenza di micoplasma è stato utilizzato il Mycoplasma Stain Kit (Sigma Aldrich, St Louis Mo. USA). Prima di essere incubate con le micotossine le cellule sono state messe in coltura fino ad ottenere una densità di 2×10^7 cellule/fiasca.

Dopo di che le cellule T Jurkat sono state esposte per 24 ore a BEA-ENN B (0,01 μ M, 0,1 μ M e 0,5 μ M) in DMSO allo 0,5%. Per stabilire le concentrazioni di

micotossine a cui esporre le cellule ci si è basati su concentrazioni rilevate in campioni ambientali (Tabella 1).

Tabella 1 Relazione tra livelli di contaminazione alimentare da micotossine e concentrazione plasmatica

Plasma concentration (μM)	Food contamination ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
	BEA	EN B
0.01	7.8	6.4
0.1	78	64
0.5	390	320

4.1.3. Estratti arricchiti di mitocondri

Dopo l'esposizione alla micotossina, è stato eseguito un lavaggio con PBS e il trasferimento in una nuova provetta. Successivamente sono stati isolati i mitocondri mediante il kit di isolamento dei mitocondri (Thermo Scientific™), seguendo un metodo non meccanico basato su reagenti specifici. I pellet mitocondriali ottenuti sono stati mantenuti a -80°C fino all'estrazione delle proteine.

4.1.4. Preparazione del campione per la proteomica

I pellet di proteine mitocondriali ottenuti sono stati risospesi in $100\ \mu\text{L}$ di tampone (8M urea/2M tiourea), omogeneizzati mediante vortex e sonicati tre volte per 3 secondi su ghiaccio, ciascuno per nove cicli (Ultrasuoni SonoPlus GM 4100, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlino, Germania). Per la determinazione della concentrazione proteica è stata eseguita un'ulteriore centrifugazione per 30 minuti a 4°C a 13000xg ed è stato poi utilizzato il Bio-Rad Protein Assay¹¹ (Bio-Rad Laboratories, California, USA). Le aliquote dei campioni sono state conservate a -80°C .

4.1.5. Preparazione di estratti peptidici per la proteomica quantitativa

Le aliquote di campione di circa $2\ \mu\text{g}$ sono state diluite con bicarbonato di ammonio, ridotte con DTT e alchilate con iodoacetammide per poi essere digeriti con tripsina (1:50) overnight a 37°C per 18 ore. La reazione è stata interrotta con acido acetico a una concentrazione finale pari all'1% e le miscele di peptidi sono state dissalate in colonnine C-18 in fase inversa (ZipTip $\mu\text{-C18}$, Merck KGaA, Darmstadt, Germania). I peptidi sono stati eluiti in acetonitrile, concentrati fino a $2\ \mu\text{L}$ in un concentratore a vuoto (SPD1010 SpeedVac™ System, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) per 10 minuti a temperatura ambiente e sciolti in acido acetico allo 0,1%: acetonitrile (98:2 v/v) fino a raggiungere la concentrazione finale di $0,1\ \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

4.1.6. Spettrometria di massa label-free e analisi dei dati

Per ogni campione biologico sono state eseguite due repliche tecniche; l'analisi è stata effettuata mediante nano LC-UDMSE (ACQUITY UPLC M-Class System accoppiato con SYNAPT G2-Si High Definition Mass Spectrometer with NanoLockSpray Exact Mass Ionization Source, Waters Corp, Massachusetts, USA). I peptidi triptici ottenuti sono stati separati su due colonne a fase inversa: ACQUITY UPLC M-Class T3 accoppiata con ACQUITY UPLC M-Class. Per l'eluizione è stato

¹¹ Tecnica spettroscopica utilizzata per misurare la concentrazione di proteine in una soluzione.

utilizzato un gradiente non lineare di 105 min di 7%–60% acetonitrile 0,1% di acido formico a una portata di 300 nL/min. I dati sono stati acquisiti utilizzando il software MassLynx™ ed elaborati con Progenesis Q1 per la raccolta e l'allineamento dei picchi.

Utilizzando il motore di ricerca di Uniprot/Swissprot (09/2017) limitato a voci umane sono stati cercati i picchi; la specificità enzimatica è data dalla tripsina consentendo un massimo di 1 scissione mancata, tenendo la carbamidometilazione della cisteina come modifica fissa e l'ossidazione della metionina come modifica variabile. La tolleranza è stata fissata per un false discovery rate inferiore (FDR) al 4% e le proteine sono state considerate significativamente identificate se sono stati soddisfatti i seguenti requisiti di corrispondenza ionica: frammenti/peptide ≥ 1 , frammenti/proteina ≥ 3 e peptidi/proteina ≥ 1 .

4.1.7. Analisi funzionale delle proteine

Per ottenere una maggiore comprensione del significato biologico delle 340 proteine individuate è stata utilizzata l'analisi della gene ontology (GO). In seguito, sono stati utilizzati i software DAVID e PANTHER per classificare e identificare tutte le proteine allo scopo di consentire un'analisi high-throughput.

4.2. Studi in silico e *in vitro* sulle micotossine e sui loro cocktail; la loro tossicità e mitigazione della tossicità mediante pretrattamento con silibinina (Tran et al. 2020)

In questo articolo, partendo da un integratore a base di cardo mariano nel quale è stata rilevata la presenza di micotossine prodotte da *Fusarium*, si sono interrogati su quale potesse essere l'effetto sulle cellule dell'esposizione di più micotossine contemporaneamente. Per alcune di queste micotossine, vale a dire DON, HT2, T2 e ZEA, il rischio per la salute umana è stato valutato dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ed esistono limiti massimi appropriati per prodotti alimentari specifici (1881/2006 CE). Per altre micotossine, come DAS, ENN, BEA, MPA, l'EFSA non ha ancora fissato i valori di assunzione giornaliera tollerabile (TDI).

Inoltre, durante gli studi effettuati, Tran et al. 2020 hanno testato se la silibinina, il principale componente attivo della silimarina, estratta anch'essa dal cardo mariano, potesse intervenire nel mitigare la tossicità.

4.2.1. Reagenti e strumentazione

Di seguito sono riportati i reagenti chimici e i terreni di coltura acquistati da Sigma-Aldrich (USA): Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), Minimum Essential Medium (MEM), soluzioni di tripsina/EDTA, miscela antibiotica (penicillina e streptomycin), tampone fosfato salino (PBS), resazurina sale sodico, silimarina, silibinina e micotossine. Le soluzioni di T-2, HT-2, DAS, DON, BEA, ZEA, ENN-A, ENN-A1, ENN-B, ANN-B1, AOH, AME, TEN e MPA sono state preparate in metanolo e mantenute a -20 °C al buio. Le concentrazioni finali di metanolo nelle soluzioni di micotossine nel terreno di coltura erano $\leq 1\%$ (v/v).

4.2.2. Linee cellulari e colture cellulari

Le linee cellulari utilizzate (Caco-2, RAW264.7, HepG2 e HEK293T) sono state ottenute da ATCC (USA). RAW 264.7 e HEK 293T sono state coltivate in DMEM,

mentre le cellule Caco-2 e HepG2 in MEM. Entrambi i terreni sono stati integrati con siero bovino fetale (FBS) (10%) e 1% di miscela antibiotica (penicillina, 100 U/mL e streptomina, 100 g/mL).

Successivamente le cellule sono state incubate a 37 °C in atmosfera al 5% di CO₂. Per il conteggio le cellule sono state messe in una soluzione allo 0,05% di tripsina e allo 0,02% di EDTA e poi sono state seminate in piastre da 96 pozzetti per i saggi di citotossicità; le cellule Caco-2 sono state utilizzate per il sistema di co-cultura.

4.2.3. Integratore alimentare a base di cardo mariano

L'integratore alimentare a base di cardo mariano (Ostropestre[™]ec plus, Farmax[®], Ruakura, Nuova Zelanda) è stato acquistato sul mercato ceco. L'etichetta riportava la seguente composizione: estratto di cardo mariano (*Silybum marianum*, seme) 250 mg in una capsula, standardizzato per contenere l'80% di silimarina. Le capsule di integratore sono state pesate separatamente e poi mescolate al fine di ottenere un campione rappresentativo. Da una prima analisi quantitativa è emerso che il contenuto di micotossine per capsula è pari a 4 ng. Questo contenuto è stato ricalcolato in base alla dose giornaliera raccomandata indicata dal produttore e al volume di sangue nel corpo umano (5 L) ottenendo i seguenti valori: 8 nM AOH, 4,5 nM AME, 9,4 nM DON, 6,2 nM T-2, 5,0 nM HT-2, 0,04 nM DAS, 1,1 nM ZEA, 3,7 nM TEN, 3,5 nM BEA, 0,7 nM ENN-A, 1,7 nM ENN-A1, 2,7 nM ENN-B e 2,6 nM ENN-B1. La concentrazione di silibinina, il componente più abbondante del complesso di silimarina, era pari a 29 µM.

4.2.4. Saggio di citotossicità

Le cellule sono state contate tramite Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA) per poi essere aliquotate in una piastra a 96 pozzetti e, quindi, incubate per 24 ore a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

In seguito, sono stati aggiunti i composti da testare. Prima di essere esposte alle micotossine le cellule sono state pretrattate con silibinina. Dopo 72 ore di incubazione è stata valutata la vitalità cellulare tramite saggio della resazurina standard. Infine è stata misurata la fluorescenza servendosi di un lettore di micropiastre SpectraMax i3x (Molecular Devices, Regno Unito) a una lunghezza d'onda di 560 nm di eccitazione/590 nm di emissione.

4.2.5. U-HPLC-MS Determinazione di micotossine e silibinina

Dopo i trattamenti con micotossine e silibinina le cellule sono state raccolte e preparate per l'estrazione dei composti mediante etanolo. Gli estratti sono stati analizzati mediante U-HPLC-MS. Per la taratura è stato utilizzato un campione esterno ad intervalli di concentrazione di 0,1-200 ng/mL per le micotossine e 50-2500 ng/mL di silibinina. La ripetibilità del metodo, espressa come deviazione standard relativa (RSD), è stata valutata mediante analisi ripetute (n = 7) di campioni di controllo. I limiti di quantificazione (LOQ), valutati per ciascuno degli analiti come il livello più basso del lotto di calibrazione all'interno dell'intervallo di concentrazione lineare, erano 0,1–0,5 ng/mL per particolari micotossine e 50 ng/mL per la silibinina.

4.2.6. Effetto combinato delle micotossine nelle miscele binarie

Per valutare l'effetto combinato delle micotossine è stato calcolato un indice di combinazione (IC). Questo indice è riconosciuto come misura standard dell'effetto combinato dove $CI < 0.9$, $0.9 \leq CI \leq 1.1$ e $CI > 1.1$ indicano rispettivamente

sinergismo, additività e antagonismo. L'IC del modello di "effetto di interazione lineare" può essere calcolato come:

$$CI = \frac{\text{observed effect (mycotoxin 1)} + \text{observed effect (mycotoxin 2)}}{\text{observed effect (mycotoxin 1 + mycotoxin 2)}}$$

4.2.7. Saggio di genotossicità

Per valutare la genotossicità è stato utilizzato il metodo dell'elettroforesi su gel a singola cellula (Comet assay). Per eseguire questo saggio le cellule HEK 293T vengono seminate in piastre da 12 pozzetti (106 cellule/mL) e trattate con micotossine (25 µM) o una combinazione di micotossina (25 µM) e silibinina (25 µM) per 24 ore.

Le cellule per il controllo positivo invece sono state trattate con 100 µM H₂O₂ in PBS per 10 minuti a 37°C.

Successivamente le cellule sono state staccate usando tripsina (EDTA) e sono state stoccate a -160°C.

Per eseguire il Comet assay la sospensione cellulare è stata centrifugata a 1000xg per 1 min e il pellet è stato risospeso in 0,5 mL di PBS. Un'aliquota di 50 µL della sospensione è stata miscelata con 150 µL di agarosio LMP (0,01 g/mL).

Sono stati infine prelevati 80 µL di sospensione cellulare e piastrati su un vetrino con agarosio all'1%. Le cellule nei vetrini sono state lasciate solidificare, successivamente è stata eseguita una lisi cellulare, seguita da elettroforesi su gel e colorazione finale. I vetrini così preparati sono stati valutati utilizzando un software di analisi delle immagini (ImageJ 1.51s, National Institutes of Health, WI, USA) collegato a un microscopio a fluorescenza (AX70 Provis, Olimpo, Giappone).

5. Risultati

5.1. Il profilo proteomico mitocondriale indica la fosforilazione ossidativa come bersaglio principale per la miscela di Beauvericina ed Enniatina B (Alonso-Garrido et al. 2020)

5.1.1. Analisi proteomica delle cellule Jurkat esposte a BEA:ENN B

I risultati ottenuti da questo esperimento dimostrano come l'esposizione ad ENN e BEA comporti l'alterazione nell'espressione di circa 115 proteine, di cui 54 hanno mostrato livelli più alti rispetto al controllo e 61 livelli più bassi. Tra tutte le proteine che mostrano alterazione dell'espressione, la più abbondante è l'omologo della subunità TOM7 del recettore di importazione mitocondriale (TOMM7), mentre la proteina transmembrana 263 (TMEM263) presenta il livello di alterazione più basso. Le restanti 225 proteine mostrano livelli alterati a seconda delle concentrazioni di micotossine utilizzate, ma non seguono alcun modello relativo al controllo.

Si nota inoltre che delle 83 proteine mitocondriali individuate da DAVID, 28 appartengono alla membrana mitocondriale interna.

Per quanto concerne la via della fosforilazione ossidativa, 7 proteine sono state trovate alterate nel complesso I, 1 nel complesso II, 2 nel complesso III, 2 nel complesso IV e 10 nel complesso V.

5.2. Studi in silico e *in vitro* sulle micotossine e sui loro cocktail; La loro tossicità e mitigazione della tossicità mediante pretrattamento con silibinina (Tran et al. 2020)

5.2.1. Tossicità acuta delle micotossine nelle miscele binarie

Lo studio delle interazioni tra le miscele di micotossine ha evidenziato che la miscela contenente T-2, HT-2 e DAS ha causato il 50% di mortalità cellulare, mentre le altre non hanno ridotto significativamente la vitalità cellulare.

In generale, si osserva che le combinazioni binarie hanno abbassato la vitalità cellulare rispetto ai singoli composti; in particolare, la miscela di T-2 e DAS così come la loro combinazione con HT-2 e alcuni altri (ENN A1+DAS e MPA+DAS) ha ridotto significativamente la vitalità cellulare del 31%, 33%, 24%, 16% e 15%, rispettivamente.

In Tabella 2 si può osservare l'effetto additivo delle miscele binarie di T-2 con BEA e anche delle miscele binarie di HT-2 con ENN-A1, ENN-B1 e BEA. Pertanto, ogni combinazione binaria di T-2, DAS e HT-2 con BEA ha avuto un effetto additivo.

La miscela binaria di BEA e T-2 ha dimostrato di avere effetto antagonista nelle cellule Vero, mentre risulta sinergica nelle cellule CHO-K1.

Inoltre, sono stati osservati effetti sinergici sia nelle miscele binarie di T-2 con ENN-A, ENN-B1, sia per HT-2 combinato con ENN-A o ENN-B.

In generale quindi, le ENN hanno causato un effetto sinergico o almeno additivo tranne due combinazioni (T2 con ENN-A1 o ENN-B) in cui è stato osservato un effetto antagonista.

L'effetto additivo o sinergico osservato per le combinazioni con ENN e BEA potrebbe essere imputabile al fatto che queste due micotossine aumentano la permeabilità cellulare e quindi rendono le cellule più accessibili per le altre micotossine che agiscono come ionofori.

Tabella 2 Gli indici di combinazione delle miscele binarie di micotossine su HEK293T dopo 72 ore di esposizione. Gli indici riportano il meccanismo dell'esposizione combinata. T-2, HT-2 e DAS sono stati applicati in dosi IC50 in una miscela con un'altra micotossina in un rapporto 1:1. L'indice di combinazione (CI) <0.9, 0.9 ≤ CI ≤ 1 e CI > 1 indicano rispettivamente sinergismo (Syn), additività (Add) e antagonismo (Ant).

Mycotoxins	DAS	HT-2	DON	ZEA	ENN A	ENN A1	ENN B	ENN B1	TEN	MPA	BEA
Mixture of T-2 (3.87 nM)	0.64 ± 0.01 Syn	0.67 ± 0.04 Syn	1.29 ± 0.13 Ant	0.92 ± 0.01 Add	0.86 ± 0.07 Syn	1.27 ± 0.13 Ant	1.11 ± 0.10 Ant	0.88 ± 0.07 Syn	0.92 ± 0.07 Add	0.85 ± 0.05 Syn	0.95 ± 0.07 Add
Mixture of DAS (6.58 nM)		0.54 ± 0.03 Syn	0.88 ± 0.17 Syn	0.85 ± 0.07 Syn	0.83 ± 0.05 Syn	0.79 ± 0.04 Syn	0.79 ± 0.08 Syn	0.82 ± 0.06 Syn	0.92 ± 0.17 Add	0.83 ± 0.07 Syn	0.96 ± 0.04 Add
Mixture of HT-2 (21.22 nM)			0.87 ± 0.04 Syn	0.83 ± 0.03 Syn	0.80 ± 0.06 Syn	0.93 ± 0.01 Add	0.87 ± 0.05 Syn	0.90 ± 0.05 Add	0.94 ± 0.04 Add	0.90 ± 0.04 Add	0.91 ± 0.04 Add

5.2.2. Effetti protettivi della silibinina contro la genotossicità da micotossine

È stato osservato che l'aggiunta di silibinina in colture di cellule HEK 293T riduce il danno al DNA indotto da ENN (Figura 3). Inoltre, è stato dimostrato che la silibinina è dotata di attività antiossidante e protettiva nei confronti dei ROS in diverse linee cellulari: tale attività può essere la ragione per la quale l'aggiunta di silibinina comporta minori effetti genotossici in cellule esposte alle micotossine.

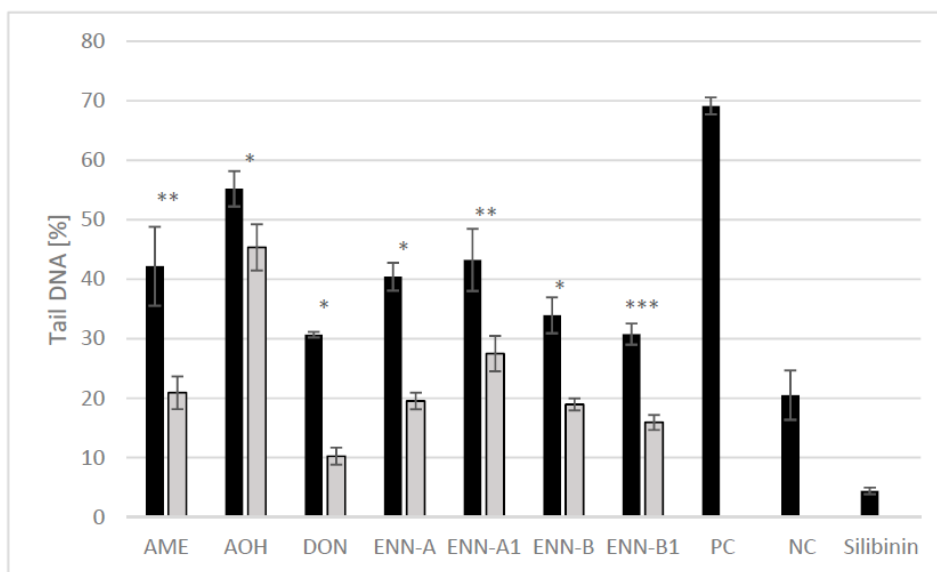


Figura 3 Effetto inibitorio della silibinina sul danno al DNA indotto dalle micotossine nelle cellule HEK 293T. I valori sono espressi come media \pm SEM ($n = 4$). Gli asterischi indicano differenze significative tra cellule trattate con silibinina (colonne grigie) e non trattate con silibinina (colonne nere) causate da micotossine: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$.

6. Discussione e conclusioni

Prendendo in esame i risultati ottenuti dagli articoli trattati in questa tesi, si evince che l'esposizione a queste micotossine comporta evidente alterazione dell'espressione di proteine mitocondriali in diverse linee cellulari.

In particolare, da tali dati emerge che molte delle proteine di membrana mitocondriale presentano espressione alterata: tale alterazione dell'espressione coinvolge proteine della via di fosforilazione ossidativa e questo potrebbe essere la causa della formazione di ROS con conseguenti effetti genotossici sulla cellula. Inoltre, come si evince dal secondo articolo preso in esame, l'azione combinata di più micotossine può avere effetti principalmente additivi e sinergici comportando un'aumentata mortalità cellulare. Tale dato risulta particolarmente interessante se si valuta che in campioni di alimenti spesso viene rilevata la contemporanea presenza di più micotossine.

Sembra inoltre che la presenza di un antiossidante come la silibinina aiuti a mitigare gli effetti genotossici delle micotossine fornendo degli spunti interessanti per studi futuri.

La mancanza di dati consolidati sull'assorbimento e sul metabolismo *in vitro*, così come la mancanza di studi sulla distribuzione, sul metabolismo e sull'escrezione *in vivo* comporta una non completa caratterizzazione, la quale non permette una regolamentazione più rigida riguardo la presenza di queste sostanze nei cibi destinati al consumo umano ed animale.

L'argomento risulta essere ancora più interessante andando a prendere in considerazione il cambiamento climatico in atto e i recenti problemi di approvvigionamento delle materie prime dovuti a contesti sociopolitici.

Ulteriori studi potrebbero essere affrontati mediante l'utilizzo delle nuove tecniche -omiche e con i nuovi software di predizione *in silico* in modo da ottenere maggiori riscontri riguardo la tossicità delle micotossine emergenti.

7. Bibliografia

- Alonso-Garrido, M., L. Manyes, I. E. Pralea, e C. A. Iuga. 2020. «Mitochondrial Proteomics Profile Points Oxidative Phosphorylation as Main Target for Beauvericin and Enniatin B Mixture». *Food and Chemical Toxicology* 141 (luglio): 111432. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111432>.
- Föllmann, Wolfram, Claudia Behm, e Gisela H. Degen. 2009. «The Emerging Fusarium Toxin Enniatin B: In-Vitro Studies on Its Genotoxic Potential and Cytotoxicity in V79 Cells in Relation to Other Mycotoxins». *Mycotoxin Research* 25 (1): 11–19. <https://doi.org/10.1007/s12550-008-0002-y>.
- Juan-García, Ana, Lara Manyes, María-José Ruiz, e Guillermina Font. 2013. «Applications of Flow Cytometry to Toxicological Mycotoxin Effects in Cultured Mammalian Cells: A Review». *Food and Chemical Toxicology* 56 (giugno): 40–59. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.02.005>.
- Kalayou, Shewit, Doreen Ndossi, Caroline Frizzell, Per Kristian Groseth, Lisa Connolly, Morten Sørli, Steven Verhaegen, e Erik Ropstad. 2015. «An Investigation of the Endocrine Disrupting Potential of Enniatin B Using in Vitro Bioassays». *Toxicology Letters* 233 (2): 84–94. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.01.014>.
- Lin, Hen-I., Yih-Jing Lee, Bing-Fang Chen, Meng-Chao Tsai, Jen-Lin Lu, Cheng-Jen Chou, e Guey-Mei Jow. 2005. «Involvement of Bcl-2 Family, Cytochrome c and Caspase 3 in Induction of Apoptosis by Beauvericin in Human Non-Small Cell Lung Cancer Cells». *Cancer Letters* 230 (2): 248–59. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.12.044>.
- Mallebrera, Beatriz, Alessandra Prosperini, Guillermina Font, e María José Ruiz. 2018. «In Vitro Mechanisms of Beauvericin Toxicity: A Review». *Food and Chemical Toxicology* 111 (gennaio): 537–45. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.019>.
- Mei, Li, Lixin Zhang, e Renke Dai. 2009. «An inhibition study of beauvericin on human and rat cytochrome P450 enzymes and its pharmacokinetics in rats». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 24 (3): 753–62. <https://doi.org/10.1080/14756360802362041>.
- Prosperini, Alessandra, Houda Berrada, María José Ruiz, Francesca Caloni, Teresa Coccini, Leon J. Spicer, Maria Chiara Perego, e Alessandra Lafranconi. 2017. «A Review of the Mycotoxin Enniatin B». *Frontiers in Public Health* 5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2017.00304>.
- Rodríguez-Carrasco, Yelko, Daniela Heilos, Lennart Richter, Roderich D. Süssmuth, Petra Heffeter, Michael Sulyok, Lukas Kenner, Walter Berger, e Rita Dornetshuber-Fleiss. 2016. «Mouse Tissue Distribution and Persistence of the Food-Born Fusariotoxins Enniatin B and Beauvericin». *Toxicology Letters* 247 (aprile): 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.02.008>.
- Tran, Van Nguyen, Jitka Viktorova, Katerina Augustynkova, Nikola Jelenova, Simona Dobiasova, Katerina Rehorova, Marie Fenclova, et al. 2020. «In Silico and In Vitro Studies of Mycotoxins and Their Cocktails; Their Toxicity and Its Mitigation by Silibinin Pre-Treatment». *Toxins* 12 (3): 148. <https://doi.org/10.3390/toxins12030148>.