

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



Micotoxinas en el Espacio: Detección con ELISA según OD450 de
Ocratoxina A producida por *Penicillium rubens* al exponerse a
microgravedad

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
María Granados Presa para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2023

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA
Facultad de Ciencias y Humanidades



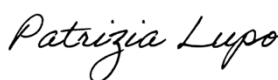
Micotoxinas en el Espacio: Detección con ELISA según OD450 de
Ocratoxina A producida por *Penicillium rubens* al exponerse a
microgravedad

Trabajo de graduación en modalidad de Tesis presentado por
María Granados Presa para optar al grado académico de
Licenciada en Bioquímica y Microbiología

Guatemala,

2023

Vo.Bo.:

(f) 

Patrizia Lupo, Ph.D.

Tribunal Examinador:

(f) 

Dra. Patrizia Lupo, Ph.D.

(f) 

Dalia Lau Bonilla, Ph.D.

(f) 

Krisztina Rios, Ph.D.

Fecha de aprobación: Guatemala, 05 de diciembre de 2023

PREFACIO

Desde segundo año de estudio en la licenciatura en Bioquímica y Microbiología me empecé a involucrar en el área espacial. Desde un inicio no sabía nada y fue por participar con un grupo de amigos que empezamos a aprender y participar en actividades virtuales. Nuestra iniciativa captó la atención de guatemaltecos que estaban involucrados en esta área de estudio y fue Luis Zea quien me abrió las puertas para lograr esta investigación. En dicho año me comentó de la posibilidad de proponer un estudio a la Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio (NASA) dado que iban a enviar muestras del hongo *Penicillium rubens* a la Estación Espacial Internacional (EEI) con el proyecto *Space Biofilms*. En un inicio no supe cómo hacerla ni tuve la seguridad de que podía hacer algo tan grande en ciencia, sin embargo, Luis y Pamela Flores me motivaron a relacionar las condiciones del proyecto con salud, que era el área de estudio que más me interesaba. Tras una segunda oportunidad de entregar una propuesta, comencé un camino autodidacta que me llevó, no solo a la aceptación de la propuesta presentada en esta investigación sino me dio la oportunidad de trabajar en un laboratorio de NASA en *Eastern Virginia Medical School* (EVMS), Virginia ayudando en la preparación de las muestras fúngicas que Space Biofilms envió al Espacio en la misión NG-17, las cuales, son las mismas que utilicé en este proyecto. Por lo tanto, agradezco a Luis Zea por confiar en mi potencial e incentivarme a hacer una propuesta que conectara las áreas de estudio de mi interés aunque, en un principio no parecían tener relación alguna. Extiendo mi agradecimiento a Pamela Flores por darme seguimiento y apoyo hasta la fecha y ser una gran mentora junto a Luis y personalmente ayudarme a poder haber tenido dicha experiencia. Por otro lado, agradezco a las personas involucradas desde el inicio de esta trayectoria; Rodrigo González, quien me guió desde un inicio para dar forma a mi idea y redacción, así como compartió sus conocimientos y consejos en la formulación de proyectos. Agradezco a la Dra. Pennington y la Dra. Lupo por su guía y apoyo durante mis análisis en Guatemala, así como a la Universidad del Valle de Guatemala por permitirme el uso de las instalaciones. Doy gracias al instituto de investigación *BioServe Space Technologies*, la Universidad de Colorado y a EVMS por permitir el uso de sus instalaciones y recursos para partes clave de este proyecto. Asimismo, a NASA por brindarme las muestras enviadas en la misión NG-17 tanto incubadas en la Tierra como en la EEI.

Personalmente agradezco a mi tía Valerie Lascoutx de Presa y mi tío Pedro Miguel Presa, junto a la Universidad de Salamanca, quienes hicieron posible que yo pudiera estudiar y culminar esta licenciatura. A mi tío Julian Presa por apoyarme a poder vivir la experiencia de investigación en EVMS y a mi familia por su apoyo durante estos cinco

años. Motivo a estudiantes que lean la presente investigación a que busquen grandes oportunidades y confien en ustedes mismos para lograr cosas que en algún momento consideraron imposibles.

ÍNDICE

PREFACIO	v
LISTADO DE FIGURAS	x
LISTADO DE CUADROS	xii
LISTADO DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
A. Riesgo indirecto a través de alimentos	1
B. Riesgo a través de las mucosas.....	2
II. OBJETIVOS.....	3
A. Objetivo general	3
B. Objetivos específicos.....	3
III. JUSTIFICACIÓN.....	4
IV. MARCO TEÓRICO.....	5
A. Hongos	5
1. Hongos patógenos	5
2. Hongos oportunistas	6
B. Micotoxinas	7
C. Género <i>Penicillium</i>	7
1. Características del género.....	7
2. <i>Penicillium rubens</i>	9
3. <i>P. rubens</i> como patógeno oportunista	10
D. Micotoxinas de <i>P. rubens</i>	10
1. Roquefortina C	10
2. Ocratoxina A	11
V. ANTECEDENTES.....	14
VI. METODOLOGÍA	15
A. Características de la investigación.....	15

1.	Tipo de investigación	15
2.	Preguntas de investigación	15
3.	Hipótesis.....	15
4.	Variables.....	16
B.	Control de producción general de OTA	16
C.	Diseño de muestreo	17
D.	Preparación de muestras previo al vuelo	17
1.	Preparación y limpieza de laboratorio y material	17
2.	Preparación de PBS	17
3.	Agar de papa glucosa (PGA).....	17
4.	Cultivo madre	18
5.	Caldo de dextrosa de patata (PDB).....	19
6.	Inoculación del hongo en placa	19
7.	Preparación de PFA AL 4%	20
8.	Carga de jeringas de Tierra.....	20
9.	Carga de jeringas de vuelo	20
10.	Preparación de placas de 24 pocillos	21
11.	Preparación de cupones	22
12.	Inoculación de cupones y ensamblaje en placa	23
13.	Activación e inactivación de la incubación	24
E.	Detección de OTA mediante ELISA	25
1.	Curva estándar	25
2.	Extracción.....	25
3.	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA).....	25
4.	Análisis estadístico	25
VII.	RESULTADOS	26
A.	Validación de extracción, estandarización y datos crudos.....	26
B.	Procesamiento de datos crudos.....	29
C.	Tendencias de producción de OTA en la Tierra y bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI).....	31

D.	Análisis por proporciones.....	35
VIII.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	37
A.	Toma decisiones para análisis de resultados	37
B.	Preservación de la muestra con <i>RNAlater</i>	37
C.	Estandarización	39
D.	Detección de OTA por <i>P. rubens</i> , bajo microgravedad.....	41
E.	Ventajas del método de ELISA para futuras aplicaciones espaciales.....	44
F.	Mejoras y siguientes pasos	44
IX.	CONCLUSIONES	46
X.	RECOMENDACIONES	47
XI.	REFERENCIAS.....	48
XII.	ANEXOS	59
A.	Script utilizado para análisis estadístico y generación de gráficas en RStudio (versión 4.1.2.)	62

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de ramificación del conidióforo de <i>Penicillium spp.</i>	8
Figura 2. Morfología microscópica de <i>P. rubens</i>	9
Figura 3. Estructura química de micotoxinas.....	12
Figura 4. Estríado en 6X6 de cultivo de <i>P. rubens</i>	19
Figura 5. Jeringas de vuelo.....	21
Figura 6. Placa de 24 pocillos con <i>risers</i>	21
Figura 7. Esterilización y preparación de cupones.....	23
Figura 8. Inoculación de hongo en cupones y preparación de placas.....	24
Figura 9. Curvas de calibración de absorbancia a 450nm.....	28
Figura 10. Estadística descriptiva de datos de estandarización.....	29
Figura 11. Análisis de distribución y comportamiento de datos crudos de absorbancia de OTA.....	30

Figura 12. Distribución de absorbancias de OTA corregidas dentro de los límites para cada muestra independiente de hongo.....	32
Figura 13. Tendencia de absorbancia de OTA en función de tiempo de incubación en Tierra y EEI de muestras de hongo en triplicado para cada día de incubación.....	33
Figura 14. Tendencia de absorbancia de OTA en función de tiempo de incubación en Tierra y EEI de muestras de hongo en triplicado para cada día de incubación.....	33
Figura 15. Comparación paralela de las absorbancias promedio de OTA de las muestras de <i>P. rubens</i> representativas de la Tierra y Espacio en función de los días de incubación.....	34
Figura 16. Comparación de absorbancias relativas en función de los días de incubación y de la proporción EEI:Tierra.....	36
Figura 17. Ensayos de extracción de OTA en <i>RNAlater</i> con distintos tratamientos.....	59
Figura 18. Propuestas de rutas biosintéticas de producción de OTA presentada por El Hajj Assaf et al. (2020) modificada con influencia de gen <i>hdaA</i>	61

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1. Variables de la investigación y su descripción conceptual y operacional	16
Cuadro 2. Datos crudos de absorbancias.....	27
Cuadro 3. Mapa de placa de 96 pocillos para realización de ELISA.....	60

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
EEI: Estación Espacial Internacional
ELISA: Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas
EVMS: *Eastern Virginia Medical School*
FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
MIT: Instituto Tecnológico de Massachusetts
NASA: Administración Nacional de Aeronáutica y el Espacio
NRP: Sintetasa de péptidos no ribosomales
OTA: Ocratoxina A
PKS: Policétido sintasa

RESUMEN

El presente trabajo de graduación es una investigación tipo experimental bajo condiciones controladas, en la cual, se buscó detectar la producción de la micotoxina Ocratoxina A (OTA) por el hongo *Penicillium rubens* bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI). Se realizó mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) adaptado al protocolo del tratamiento de muestras del proyecto *Space Biofilms*. La razón de realizar esta investigación fue para determinar el potencial riesgo que presentan en el Espacio las micotoxinas y hongos hacia la salud de los astronautas y comparar las tendencias de comportamiento metabólico de dicho hongo en la Tierra y bajo microgravedad. Se logró demostrar que sí producen OTA al incubarse bajo microgravedad en la EEI e incluso lo hacen en proporciones y tendencias distintas a las muestras de Tierra. Los resultados de esta investigación generaron nuevos conocimientos relacionados al impacto que pueden tener las micotoxinas en la salud de los astronautas. Sin embargo, hubo limitantes del diseño de tratamiento y estandarización, por lo cual, se recomienda desarrollar investigaciones que optimicen la manera de tratar las muestras y faciliten las tecnologías utilizadas para la detección de micotoxinas en el Espacio.

I. INTRODUCCIÓN

P. rubens puede causar alergias y colonizar las vías respiratorias, así como producir reactividad en la piel dado que se consideran patógenos oportunistas (Avilés-Robles et al., 2016), por lo cual, las personas inmunodeprimidas son más propensas a desarrollar infecciones de este tipo de patógenos. Los resultados de dos investigaciones colaborativas de la NASA; "Validación de procedimientos para monitorear la función inmune de los miembros de la tripulación (Inmune integrado)" y "Evaluación de nutrición clínica de astronautas de la EEI, SMO-016E (Evaluación de nutrición clínica)" sugieren que los vuelos espaciales pueden alterar el sistema inmunológico de los astronautas. Esto ocurre principalmente en misiones de larga duración, y NASA tiene previsto realizar misiones de larga duración a asteroides, la Luna y Marte (Dunn & Abadie, 2017). Lo anterior puede indicar que la depresión de la actividad celular en el sistema inmunológico de los astronautas puede tener un impacto en el desarrollo de enfermedades e infecciones por hongos del ambiente. Asimismo, se ha propuesto el uso de microorganismos en el Espacio para la bioremediación, procesamiento y reciclaje de desechos humanos, alimento, síntesis farmacéutica, biomímica, biomanufactura estructural (bioconcreto o mico-arquitectura), recolección y producción de energía, reciclaje de desechos electrónicos, plásticos y otros, remediación de suelos en cultivos espaciales, y futuras tecnologías para las misiones a largo plazo e investigaciones más allá de la órbita terrestre (Santomartino et al., 2023). Por lo tanto, es importante comprender el comportamiento y riesgos de los microorganismos en las estaciones espaciales para poder optimizar su futuro uso biotecnológico y sostenible en las misiones.

La producción de OTA por parte de *P. rubens* en la Estación Espacial Internacional (EEI) puede presentar un riesgo directo o indirecto para la salud de los astronautas:

A. Riesgo indirecto a través de alimentos

Según Zhang et al. (2016) no había estudios sobre la producción de OTA en esta especie de moho hasta que lo confirmaron con análisis en 2016. Estas cepas se encontraron en uvas, y los astronautas no solo cultivan uvas en el Espacio (Tatum, 2021) sino las han recomendado como alimento debido al resveratrol (RSV) que se encuentra comúnmente en la piel de las uvas y ayuda a los astronautas a mitigar la atrofia muscular y preservar la función muscular en condiciones de gravedad reducida (Olavario, 2019). Por lo tanto, evitar la contaminación por OTA en las uvas es un objetivo importante para la salud de los astronautas en futuras misiones. Además, muchos tipos de frutos frescos y secos tienden a estar contaminados con OTA (Heshmati & Mozaffari Nejad, 2015). Como afirman Rahimi y Shakerian (2013), suelen existir tasas de incidencia de OTA altas en muchos tipos de frutos secos, incluidos los albaricoques y las uvas. Algunos incluso presentan un nivel superior al límite máximo de tolerancia aceptado por la Unión Europea (10 ng/g). Cabe recalcar que la ingeniera Shannon Walker de vuelo espacial en la expedición 64 en 2021 fue parte del estudio de fermentación de jugo de uva a bordo de la EEI. Este tipo de investigaciones de agricultura espacial buscan determinar los efectos benéficos que podrían tener las comunidades microbianas en los cultivos alimentarios y así, poder aumentar el

rendimiento y eficiencia nutricional que pueden tener. Esto facilitaría el consumo de alimentos en los vuelos espaciales dado que disminuiría el tamaño de cultivo necesario para abastecer la tasa nutricional necesaria por la tripulación (Garcia, 2021). Dado que los astronautas aún comen alimentos deshidratados, como frutas (National Center for Families Learning, 2019) y se mencionó que se espera abarcar más variedades y cantidades de alimentos para las tripulaciones, es de gran relevancia considerar una posible contaminación en cultivos y alimentos espaciales por esta micotoxina.

B. Riesgo a través de las mucosas

La presencia de microorganismos en estaciones y naves espaciales es inevitable, dentro de la cual, los hongos no se quedan atrás (Simões & Antunes, 2021). Varios estudios han demostrado la presencia de microorganismos contaminantes en las estaciones espaciales, tales como los hongos (Kumar et al., 2022). A pesar del uso de filtros de aire de alta resolución, los astronautas aún pueden inhalar esporas del aire (Satoh et al., 2021). Sin embargo, estudios sobre cómo los hongos ambientales afectan a los astronautas en las naves espaciales son escasos, incluida la Estación Espacial Internacional (EEI). Satoh et al. (2021) realizaron el análisis de hisopados nasales y faríngeos junto con la toma de muestras de saliva de 21 astronautas antes, durante y después del vuelo. Se detectó la presencia de hongos *Penicillium* incluso tras un año de estancia en la estación espacial, lo cual, aumenta la importancia de su estudio para predecir su comportamiento en futuras misiones a largo plazo. También se mencionó que, aunque no parecen ser peligrosas, se deben evaluar medidas para prevenir los trastornos de salud relacionados con los hongos. Sin embargo, no existen estudios específicos basados en la producción de micotoxinas en el Espacio (de Middeler et al., 2019).

II. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Demostrar que *P. rubens* produce OTA cuando crece bajo condiciones de microgravedad para anticipar en futuras misiones los potenciales riesgos hacia la salud de los astronautas y la contaminación tanto de alimentos como de cultivos en las estaciones espaciales.

B. Objetivos específicos

Adaptar un protocolo de extracción y análisis de un kit de ELISA comercial para detección de OTA en alimentos al método de extracción de *P. rubens* crecido en acero inoxidable y preservado en *RNAlater* según el protocolo del proyecto *Space Biofilms* descrito por Hupka, M. et al. (2023).

Comparar las tendencias de la producción de OTA de muestras crecidas en la Tierra y crecidas bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI) en función de los 10, 15 y 20 días de incubación sobre acero inoxidable mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA).

III. JUSTIFICACIÓN

El propósito de esta investigación es prever posibles riesgos que pueden tener las micotoxinas en el Espacio previniendo el riesgo de infecciones o problemas en futuras misiones. Estudios como la "Validación de procedimientos para monitorear la función inmune de los miembros de la tripulación (Inmunidad integrada)" y "Evaluación de nutrición clínica de astronautas de la EEI, SMO-016E (Evaluación de nutrición clínica)" sugieren que los vuelos espaciales pueden alterar el sistema inmunológico de los astronautas (principalmente en misiones largas) (NASA, 2016). Por otro lado, si el comportamiento de los hongos en cuanto a la producción de toxinas es distinto bajo microgravedad, se limitaría la efectividad de los tratamientos que se suelen usar en la Tierra al aplicarlos en las estaciones espaciales. El estudio de la detección de OTA y diferencias en su producción puede ayudar a anticipar los riesgos que podrían presentar los hongos en futuras misiones de largo plazo en las estaciones espaciales. Asimismo, puede presentar un método fácil de detección de toxinas, evitando posibles consecuencias graves a la salud ya sea directamente desde las mucosas o alimento.

La importancia de este tema de estudio recae en que no se ha hecho investigaciones específicas basadas en la producción de toxinas en el Espacio (de Middeleer et al., 2019). Sería la primera vez que se detecta OTA de *P. rubens* crecido bajo microgravedad en la EEI y la primera vez que se detecta OTA producida por *P. rubens* con el método de ELISA dado que se ha detectado pocas veces mediante cromatografías líquidas y aun no hay una ruta definida (Y. Wang et al., 2016). Este estudio tiene el potencial de abrir un gran campo investigación basado en toxinas u hongos y salud para futuras misiones espaciales. Esto también presentaría un nuevo protocolo de evaluación de toxinas práctico y factible que podría utilizarse en el estudio de otras toxinas de este o diferentes hongos que crecen en las estaciones espaciales, lo cual, es indispensable para futuras misiones. El éxito de este estudio daría inicio a un campo nuevo de investigación espacial relacionado al efecto de los hongos en la salud de los astronautas. Dentro de esto se encontraría una gran cantidad de investigaciones que comiencen a evaluar el comportamiento de otras toxinas en el mismo o distintos hongos encontrados en la EEI y como pasos a futuro, comenzar a desarrollar diferentes tratamientos que solucionen posibles infecciones o consecuencias en la salud de los astronautas bajo estas condiciones y comportamientos específicos.

IV. MARCO TEÓRICO

A. Hongos

El reino de los hongos conlleva alrededor de 1.5 millones de especies eucariotas, de las cuales, únicamente alrededor de 60,000 han sido descritas, siendo la mayoría terrestres (Margulis & Chapman, 2009). Los hongos contienen cinco filos verdaderos, incluidos Chytridiomycota, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota (Aguilar-Marcelino et al., 2020). Dicho reino pertenece al dominio Eukarya y se divide en mohos filamentosos multicelulares, hongos filamentosos macroscópicos que forman cuerpos fructíferos y levaduras microscópicas unicelulares (Microbiology Society, 2023). Entre las características más destacadas de los hongos está la producción de esporas, la necesidad de los hongos de alimentarse y el uso de células ramificadas largas conocidas como hifas para absorber los nutrientes del medio ambiente. Estas pueden clasificarlos metabólicamente en distintos tipos como saprótrofos, que se alimentan de materia muerta y en descomposición; parásitos, que a menudo causan daños considerables a otras especies; y especies que forman relaciones mutualistas con otras especies para formar organismos compuestos, como los líquenes (Wearing, 2010). Sin embargo, en ciertos casos la patogenicidad de los hongos va a depender de distintos factores como el hospedero, factores de virulencia, condiciones ambientales, el ambiente extracelular, disponibilidad de fuentes de energía, la capacidad de dispersión, entre otros (García-Vidal & Carratalà, 2012).

1. Hongos patógenos

Se dice de un agente patógeno a todo aquel microorganismo que puede provocar enfermedades en un huésped o perturbar la fisiología normal de este (European Society of Neurogastroenterology and Motility-ESNM, 2022). Históricamente, en el contexto de estos organismos, los términos “virulencia” y “patogénesis” se basaban en la capacidad de los hongos para producir enfermedades. Luego se centró el uso de estos términos en el patógeno, conllevando a la evolución de factores de virulencia por presiones selectivas específicas de los huéspedes. El término patogénesis tiene la etimología “pathos” que significa enfermedad y “génesis” significando desarrollo, lo cual, indica que es la capacidad de producir una enfermedad. Por otro lado, la virulencia se define como la capacidad relativa de un patógeno para causar enfermedad, por esta razón hay hongos más virulentos que otros (Cramer & Perfect, 2009). Los hongos patógenos suelen ser principalmente intracelulares, indicando que tienen cierta interacción con el hospedero e infectan cuando viven dentro de sus células. Asimismo, la mayoría de los hongos parásitos (o patógenos primarios) son más conocidos por afectar más a plantas que a animales, sin embargo, los mecanismos de infección que desarrollan pueden llegar a afectar a los animales que consumen dichas plantas en ciertas ocasiones (Gladieux et al., 2017). A pesar de lo anterior, los patógenos fúngicos tienen un gran impacto en la salud humana, siendo los principales causantes de infecciones superficiales, en las mucosas y en ciertas ocasiones pueden causar enfermedades invasivas que conllevan infecciones que ponen en riesgo la vida (Malavia et al., 2017).

Dentro de las interacciones celulares que les permiten a los hongos patógenos causar enfermedad está la adhesión, internalización del hongo, la ruta de señalización dependiente de AMP cíclico (cAMP), la cascada de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), señalizaciones en el citoesqueleto y matriz extracelular y la inducción de apoptosis (Mendes-Giannini et al., 2005). Estas interacciones les han permitido a los hongos seguir afectando distintos tipos de huéspedes, lo cual, ha resultado en un aumento significativo en la carga y frecuencia de infecciones fúngicas en los últimos 20 años, especialmente porque hay más personas deficientes de las defensas para abarcar la invasión (Staab & Wong, 2014). Asimismo, los tratamientos pueden causar alteraciones genéticas aumentando la recurrencia y adaptabilidad de los patógenos. Un mecanismo es el aumento de la variación del número de copias cromosómicas (CCNV) o aneuploidía resultante de la exposición a medicamentos antifúngicos (Farrer & Fisher, 2017). Sin embargo, existen avances de biología molecular, como CRISPR, que permiten identificar este tipo de cambios y el desarrollo de nuevos tratamientos ante estos agentes en sus distintos huéspedes (Kumar et al., 2021).

2. Hongos oportunistas

Los hongos oportunistas son un grupo potencialmente patógenos que está en constante evolución en pacientes inmunodeficientes o inmunodeprimidos (Pappas, 2010). Las infecciones fúngicas oportunistas son causadas por hongos que no son patógenos en el huésped inmunocompetente, incluso suelen ser comunes como parte del microbiota de las personas (Betancourt, 2019). Muchas levaduras y mohos pueden causar infecciones oportunistas, incluso mortales, si se encuentran en partes del cuerpo donde no suelen pertenecer o en pacientes vulnerables. Según la gravedad del caso, especie y condición física del hospedero; pueden llegar a causar infecciones diseminadas fatales, sepsis, lesiones de piel, lesiones vasculíticas angioinvasivas focales (especialmente los mohos), infecciones superficiales, entre otros (Revankar, 2023). Sin embargo, no es necesario que los hongos oportunistas entren al cuerpo humano o sean específicos para hospederos animales para causar una posible infección, esta se puede dar como resultado de rutas metabólicas al infectar plantas. Un ejemplo clave de esto es la producción de metabolitos secundarios o micotoxinas al invadir plantas y ser luego consumidas por vertebrados. La mayoría de estas micosis y micotoxicosis suelen ser causadas principalmente por hongos oportunistas y pueden llegar a tener la misma gravedad que una infección por un patógeno primario (Bennett & Klich, 2003). Otra manera de adquirir micosis suele ser a través de la inhalación de esporas de un reservorio ambiental o por el crecimiento inusual de una especie comensal que normalmente reside en el microbiota. Estas especies comensales se vuelven patógenas en presencia de fármacos antibacterianos, quimioterapéuticos o inmunosupresores, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, catéteres permanentes y otros factores predisponentes (Dixon DM et al., 1996). Por esto recae la importancia de considerar los riesgos tanto del desbalance inmunológico como de los posibles hongos oportunistas que pueden afectar directa o indirectamente al ser humano.

B. Micotoxinas

Micotoxina es el término genérico que se le da a los metabolitos secundarios tóxicos producidos por hongos, donde “Myco” proviene de moho y “toxin” representa veneno. Estos compuestos abarcan un rango bajo en la variedad de los pesos moleculares y diversidad de estructuras químicas (Arora, 2003). Las micotoxinas se producen de manera natural, sin embargo, pueden resultar afectando directa o indirectamente a animales, humanos o fuentes de alimento como plantas (WHO, 2018). Se ha demostrado que gran parte de la contaminación de cultivos de campo y almacenados se da por la presencia de micotoxinas, las cuales, presentan un peligro para la salud del consumidor. Dependiendo de las concentraciones de moho y toxinas que los alimentos presenten, las condiciones ambientales y los recursos disponibles para detectarlas a tiempo, estas pueden llegar a ser difíciles de eliminar (Girisham et al., 2010). Por esta razón, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) recalca los lineamientos, responsabilidades y obligaciones por cumplir los límites establecidos para las concentraciones de toxinas permitidas en cultivos y alimentos tanto para humanos como animales (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2018).

Una de las micotoxinas de mayor relevancia en la seguridad alimentaria es la ocratoxina A (OTA), dado que puede llegar a ser genotóxica (degrada el material genético) y carcinógena, principalmente en los riñones. La preocupación por esta toxina llevó a la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2020 a publicar un dictamen científico sobre los riesgos de la salud pública relacionados a la presencia de OTA en los alimentos ya que, es naturalmente producida por mohos comúnmente contaminantes de productos alimenticios como cereales, conservas de carne, frutos secos, queso, entre otros (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2020). La contaminación por esta toxina ha causado varias pérdidas económicas a los fabricantes y exportadores de alimentos, lo cual, ha llevado al desarrollo de nuevas técnicas de detección y eliminación de esta (Wang et al., 2022). OTA es principalmente producida por especies de hongos *Aspergillus* y *Penicillium* (Y. Wang et al., 2016) y se suele detectar mediante técnicas cromatográficas como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) o inmunoensayos como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Ha, 2015).

C. Género *Penicillium*

1. Características del género

Penicillium es un grupo de hongos filamentosos saprófitos cuya clasificación taxonómica es: dominio Eucariota, filo Ascomycota, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familia Trichocomaceae y género *Penicillium* (Aakash, 2021). Las colonias suelen crecer rápido teniendo una coloración blanca al inicio y con el tiempo azul verdoso o gris oliva, razón por la cual, se les conoce como mohos verdes o azules. Microscópicamente presentan hifas hialinas septadas y los conidióforos constan de ramas secundarias llamadas métulas, las cuales surgen en cadenas largas sin ramificación de esporas o conidios y dan la forma tipo pincel característica del género (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo

- INSST, 2022). Esto son mohos se encuentran al aire libre o lugares húmedos, cálidos y con baja luminosidad. Son altamente conocidos por la producción de la penicilina utilizada en la elaboración de antibióticos (Antigua, 2021). Sin embargo, algunos pueden ser patógenos primarios u oportunistas (Universidad de Buenos Aires, 2022).

Penicillium se reproduce de manera vegetativa, asexual o sexual. La primera es la más sencilla y surge como resultado de una rotura accidental del micelio vegetativo en dos o más fragmentos. Luego, cada fragmento crece individualmente como el micelio madre. La reproducción asexual tiene lugar mediante esporas unicelulares, uninucleadas e inmóviles llamadas conidios; formado en conidióforo. Este se desarrolla como una rama partiendo del micelio vegetativo y puede estar o no ramificado. La ramificación de esta se conoce como métula y en la punta se desarrollan esterigmas en forma de matraz. Cada uno de estos esterigmas tiene las esporas llamadas conidios, las cuales, luego de madurar se van liberando conforme nuevos conidios empujan al anterior según van surgiendo. En caso de no estar ramificado, el esterigma se desarrolla en la punta del conidióforo y siempre se dividen los núcleos por mitosis de manera que uno de los resultantes migra hacia la punta (Neelesh, 2016).

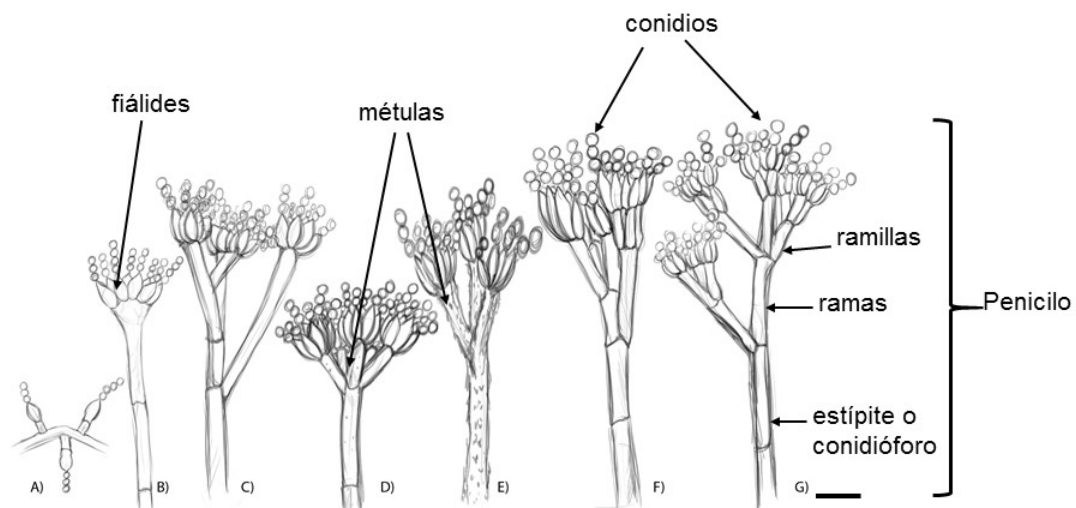


Figura 1. Tipos de ramificación del conidióforo de *Penicillium spp.* La presente figura indica los tipos de ramificación comunes en *Penicillium spp* a una escala de 10um. A) Conidióforos con fiálides separadas. B) Monoverticilados. C) Divaricado. D-E) Biverticilado. F) Terverticilado. G) Cuadriverticilado.

Fotografía: Garza, J. L. (2021)

Por otro lado, la reproducción sexual se basa en la formación de ascosporas y puede ser homotático (órganos sexuales masculinos y femeninos en el mismo talo) o heterotático (órganos sexuales masculinos y femeninos presentes en diferentes talos). El órgano sexual femenino es el ascogonio, mientras que el masculino se denomina anteridio. Las células del micelio vegetativo forman una única célula de ascogonio mientras se da una división nuclear que llega a generar de 32 a 64 núcleos. La rama de anteridio en desarrollo se enrolla alrededor de este ascogonio hasta que este madura y la pared ascogonial procede a fusionarse con el anteridio doblado. Sin la presencia de paredes celulares, el citoplasma de

las células masculinas y femeninas se mezcla, experimentando plasmogamia. Las paredes del ascogonio se dividieron repetidamente, creando varias células binucleadas que se colocan una encima de la otra, donde la última célula resultante de las divisiones crece para formar un ascus. Los cigotos diploides se someten a meiosis y mitosis para crear 8 ascosporas distintas e inmediatamente después de que la pared del ascus se disuelve, estas ascosporas se liberan y se adhieren a un sustrato adecuado para eventualmente convertirse en micelio ramificado (Vedantu, 2022).

2. *Penicillium rubens*

P. rubens, anteriormente llamado *P. chrysogenum*, es de los tres hongos de interior comúnmente suspendidos en el aire de ambientes interiores y exteriores, junto a *Aspergillus* y *Cladosporium* (Fukutomi & Taniguchi, 2015). Esta especie está extendida en regiones templadas y subtropicales o en cualquier lugar donde esté presente prácticamente cualquier fuente de material orgánico que pueda utilizar. Además de encontrarse disperso en el aire, es común medios como el suelo, material orgánico en descomposición, granos y frutas (Ozdemir, 2015). La transmisión de estas esporas se puede dar por el aire libre, agua o insectos (AAFA, 2023). Esto facilita la exposición a las esporas por varios medios; puertas, ventanas, sistemas de calefacción y/o aire acondicionado o ventilación, vestimenta, mascotas (CDC, 2022).

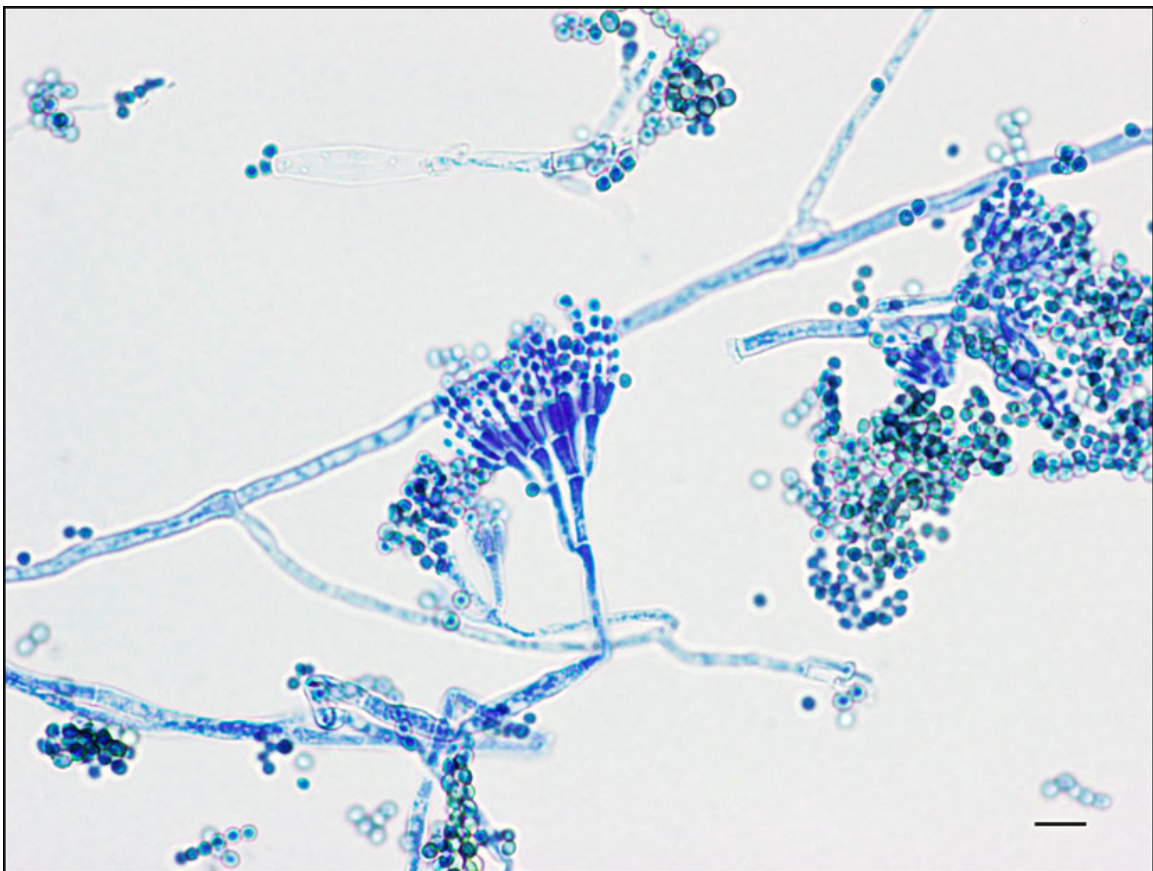


Figura 2. Morfología microscópica de *P. rubens*. La presente figura la vista en microscopio de *P. rubens* teñido con azul de lactofenol. Se detallan las ramificaciones y conidias descritas anteriormente.

Fotografía: St-Pierre, D. (2023)

3. *P. rubens* como patógeno oportunista

Penicillium es un género abundante de hongos, donde *P. chrysogenum* (*P. rubens*) es una especie dentro de este género, cuyas esporas se distribuyen ampliamente en el ambiente. Esto hace que los seres humanos estén expuestos constantemente a la propagación de estos. Dichos hongos son de los más propensos a causar alergias y colonizar las vías respiratorias, así como producir reactividad cutánea (Ozdemir, 2015). Sin embargo, se consideran patógenos oportunistas, posiblemente causante de la penicilosis. No existe un antibiótico específico para el tratamiento de penicilosis. Según informes de ciertos casos, ha habido tratamientos exitosos con anfotericina B, itraconazol o fluconazol para infecciones de *P. chrysogenum*. A pesar de haberse estudiado anteriormente *in vitro* la susceptibilidad de ciertas especies de *Penicillium* a ciertos azoles como el posaconazol, voriconazol y ravuconazol. Sin embargo, no se ha estandarizado la duración del tratamiento a pesar de que ha habido tanto casos exitosos como fracasados para tratar intravenosamente principalmente con anfotericina B infecciones diseminadas de este hongo (Avilés-Robles et al., 2016).

D. Micotoxinas de *P. rubens*

1. Roquefortina C

En el caso de la roquefortina C producida por *P. rubens*, se han reportado casos de infecciones cutáneas, esofagitis, queratitis, endoftalmitis, neumonía, endocarditis, infecciones del sistema nervioso y en el peor de los casos, infección diseminada (Avilés-Robles et al., 2016). El estudio llevado a cabo por de la Campa et al. (2007), con *P. chrysogenum* aislado de polvo asociado con materiales de construcción determinó que fue el hongo más abundante de las 28 especies encontradas en los materiales. Los resultados indicaron que la toxicidad pulmonar evaluada *in vivo* en ratones mostró resultados significativos. Al estar expuestos por vía intratraqueal a la micotoxina roquefortina C, se elevaron significativamente los niveles de proteína-2 de inflamación por macrófagos (MIP-2) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) a más de 5nM/g de peso corporal. Dado que los MIP-2 son un tipo de quimioquinas CXC y están involucrados en el reclutamiento de neutrófilos en lesiones graves (Nakamura et al., 2001), el estudio sugiere la importancia de los aspectos de la vía CXC en los efectos alérgicos asociados con el hongo evaluado. De esto, se ha visto que la producción de roquefortina C es de alta importancia dado que estudios de la expresión y cuantificación de micotoxinas por *P. rubens* llevados a cabo en la Tierra indican que se suele producir en mayor concentración la glandicolina, pero, su ruta biosintética muestra que es producto de la roquefortina C y precursor de la meleagrina, otro metabolito secundario (Ali et al., 2013).

Existen varios métodos de detección de toxinas, dentro de los cuales, está el estudio mencionado anteriormente de Ali et al. (2013), en el cual, se utilizó cepas del hongo

DS54555, la cual, carece de genes del racimo de penicilina y del gen de la proteína Ku70. Dicha cepa se usó como huésped y las micotoxinas fueron obtenidas comercialmente. Se creció las cepas en medio de cultivo YGG para la formación y transformación de protoplastos. Para el análisis se crecieron las células en medio SMP, de modo que, se promoviera la producción de metabolitos secundarios en una incubadora con agitación. Se seleccionó los plásmidos amplificando las regiones flanqueadas del gen. Cultivos de *Escherichia coli* DH5alfa se utilizaron para la transformación de alta frecuencia y amplificación del plásmido. Se transformó dichos plásmidos a *P.chrysogenum* y se utilizó el gen acetamidasa (*amdS*) para marcar la selección de la roquefortina C. Finalmente, se extrajo el ARN y se amplificó el ADN genómico para medir con un *NanoDrop* ND-1000 las concentraciones totales de ARN seguido de un Southern Blot para la confirmación. Para el análisis de expresión de roquefortina y meleagrina se llevó a cabo una reacción de cadena de polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

2. Ocratoxina A

OTA es una micotoxina neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y teratogénica. Es de gran importancia en la actualidad dado que contamina alimentos de consumo humano, principalmente cereales y derivados, bebidas alcohólicas, frutos secos y productos de molienda (Abreu et al., 2011). Los niveles de OTA en los alimentos están estrechamente relacionados con las condiciones de producción y conservación (Abreu et al., 2011). Esta es considerada la micotoxina más tóxica de su grupo y puede ser producida por varias especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (Heussner & Bingle, 2015). Esta micotoxina se encuentra entre las más importantes debido a que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) la clasifica como un carcinógeno genotóxico (Pfohl-Leskowicz & Manderville, 2007).

Entre las micotoxinas producidas por *P. rubens* se encuentra la roquefortina C como una potente neurotoxina (Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2015). Sin embargo, recientemente se ha visto que esta especie de hongos es capaz de producir otros tipos de metabolitos secundarios o micotoxinas de gran relevancia, tales como la OTA. Estudios han demostrado la posibilidad de que esta especie de hongo produzca OTA, el miembro más tóxico de su grupo (Heussner & Bingle, 2015), a pesar de que fuentes pasadas hayan negado dicha posibilidad (Perrone et al., 2017). Según Zhang et al. (2016), los estudios sobre la producción de OTA en esta especie eran inexistentes hasta que se confirmó en 2016 mediante cromatografía Líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por otro lado, se ha encontrado que ciertas especies de *Penicillium*, como *P. viridicatum*, pueden llegar a exceder el límite máximo detectable de OTA en producciones industriales al evaluar con cromatografía líquida con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Aunque, también hay especies de este género que no llegan a un límite detectable mediante este método, por lo cual, no llegan a ser consideradas toxigénicas o una preocupación industrial (Greeff-Laubscher et al., 2019).

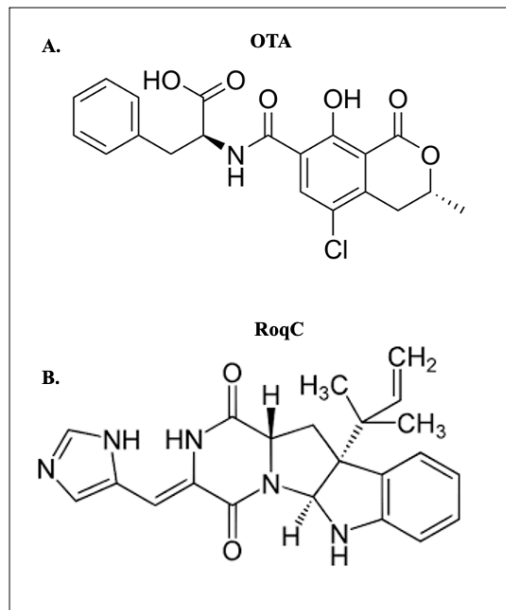


Figura 3. Estructura química de micotoxinas. La presente figura la estructura química de A) OTA y B) Roquefortina C, características de *P. rubens*.

Fotografía: A) ELISA (2020), (B) Anthoni et al. (1999)

Sin embargo, lo mencionado anteriormente se ha evaluado en condiciones normales de producción de comida o construcción y únicamente mediante cromatografías. Por lo tanto, se debe tomar en cuenta los aspectos ambientales que podrían regular el metabolismo de OTA en *Penicillium* y las posibles pruebas de identificación que se podrían realizar ya que, no se han visto estudios donde se detecte esta micotoxina en esta especie de hongo mediante ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA). Recientemente, se ha caracterizado la mayor parte del grupo de genes responsables de la biosíntesis de OTA en *Penicillium*. Al clonar un fragmento de ADN genómico de 10 kb de ciertas especies de este género, lleva tres largos marcos de lectura abiertos. Un marco de lectura abierto (otapksPN) es una policétido sintasa (PKS), que es diferente de los genes PKS que se encuentran en las especies de *Aspergillus*. El segundo marco de lectura abierto (npsPN) tiene homología con las péptido sintetisas no ribosomales, y el tercer marco de lectura abierto (aspPN) tiene homología de serina proteasas alcalinas fúngicas. En un análisis sistemático, la influencia de los parámetros de crecimiento más importantes, incluidos la temperatura, la actividad del agua y el pH, según análisis de PCR en tiempo real y *microarrays*. Todos los parámetros externos analizados han dado como resultado un perfil de expresión similar de los genes de biosíntesis de OTA, pero, no todos estos genes están presentes en todas las especies de *Penicillium*, indicando diferencias en la activación de rutas metabólicas a pesar de pertenecer al mismo género (El Khoury & Atoui, 2010). El metabolismo secundario fúngico es amplio y versátil, por lo cual, puede ser activado por reguladores específicos, factores de transcripción, rutas de transducción de señales, factores epigenéticos y ambientales (El Hajj Assaf et al., 2020) llevando a la producción de OTA por *P. rubens* a ser sumamente específica a varias restricciones celulares (Ringot et al., 2006). Dado que no existe una ruta establecida para la producción de esta toxina por parte de esta especie, a pesar de haber rutas incompletas propuestas como la del ácido shikímico con una

activación híbrida de péptidos no ribosomales (NRPs) y PKSs (Rai, M., & Bridge, P. D., 2010) es importante continuar este tipo de estudios para eliminar la incertidumbre en cuanto al riesgo que puede presentar *P.rubens* al producir OTA.

V. ANTECEDENTES

El estudio de Hupka, M. et al. (2023) llamado “Morphology of *Penicillium rubens* Biofilms Formed in Space” evaluó la morfología de muestras de hongos derivadas de un cultivo madre de una cepa comercial de *P. rubens* luego de crecer bajo gravedad terrestre y microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI). El estudio creció muestras del hongo en cupones de 1X1cm de distintos materiales; aluminio (Al6061), acero inoxidable (SS316), cuarzo, silicona, titanio (Ti-6Al-4V), fibra de carbono y una superficie desarrollada en el Instituto Tecnológico de Massachusetts (MIT) llamada *nanograss*. Se llevó a cabo una activación del crecimiento de hongos paralela en la Tierra y en la EEI, de los cuales, se realizó una comparación cualitativa de las biopelículas fúngicas según observaciones relativas de estructura y distribución según la superficie del material, tiempo de incubación y condición de gravedad. Asimismo, utilizaron el *software* COMSTAT 2 para llevar a cabo un análisis cuantitativo de la biomasa, distribución del grosor y cobertura de área superficial de la biopelícula. Finalmente se llevó un análisis estadístico usando la versión 4.1.2. del programa *RStudio*.

El objetivo principal de la investigación fue caracterizar la morfología de las biopelículas de *P. rubens* en siete materiales clínicamente relevantes para vuelos espaciales, tanto en el Espacio como en la Tierra. Se demostró que todos los materiales utilizados fueron susceptibles a la formación de biopelículas. La humedad mostró un efecto significativo entre los 10 y 20 días de incubación, lo cual, pudo haber intervenido en la comparación de muestras de la Tierra con las de la EEI. La microgravedad tuvo un efecto significativo en tres de los seis materiales, aumentando el área de superficie del *biofilm* a los 15 días en la fibra de carbono y acero inoxidable, y aumentó el grosor a los 10 y 20 días en titanio, sin embargo, no afectó la forma de las biopelículas crecidas. En cuanto al efecto de la superficie del material, el de MIT o *nanograss* fue el más eficiente para limitar la formación de biofilm. Al analizar en función del tiempo, las muestras de la Tierra en cuarzo disminuyeron grosor y las de acero el área de superficie a medida que aumentaban los días, posiblemente correlacionado al agotamiento de nutrientes o debilitamiento en adhesiones célula-célula o célula-superficie. En resumen, se vio que la microgravedad afectó en el tamaño y cantidad de biopelículas producidas por *P. rubens* en los distintos materiales, mas no afectó la forma en la que estos se desarrollaron bajo las distintas condiciones de gravedad y tiempo de incubación.

El estudio mencionado anteriormente se relaciona de manera directa con el presente estudio dado que las muestras que se utilizarán provienen de este. Cabe mencionar que, en este caso se utilizará cepas crecidas únicamente en acero inoxidable SS316 preservadas en *RNA later* luego de los 10, 15 y 20 días de incubación. En total se contará con 18 muestras independientes; 9 del control de Tierra y 9 incubadas en la EEI. Todas las muestras del presente trabajo de graduación fueron tratadas de la misma manera que el estudio de Hupka, M. et al. (2023), en *Eastern Virginia Medical School* (EVMS) dado que son parte de la muestra evaluada en dicha investigación, sin embargo, no les removieron el hongo ni fueron abiertas para poder procesar todo el contenido en el estudio de la presencia de micotoxinas.

VI. METODOLOGÍA

A. Características de la investigación

1. Tipo de investigación

Experimental bajo condiciones controladas.

2. Preguntas de investigación

- ¿*P. rubens* produce OTA bajo gravedad terrestre?
- ¿*P. rubens* produce OTA bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI)?
- ¿Cómo cambia la producción de OTA por *P. rubens* crecida bajo microgravedad comparado con la Tierra en función del tiempo?
- ¿Se puede detectar OTA producida por *P. rubens* mediante un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA)?

3. Hipótesis

- **H_{i1}**: *P. rubens* produce OTA cuando crece bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI).
- **H₀₁**: *P. rubens* no produce OTA cuando crece bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI).
- **H_{i2}**: Hay diferencia en las tendencias de producción de OTA por parte de *P. rubens* al crecer bajo microgravedad y bajo gravedad Terrestre.
- **H₀₂**: No hay diferencia en las tendencias de producción de OTA por parte de *P. rubens* al crecer bajo microgravedad y bajo gravedad Terrestre.
- **H_{i3}**: Se puede detectar la producción de OTA por *P. rubens* mediante ELISA luego del tratamiento de muestras especificado por el Proyecto “*Space Biofilms*”.
- **H₀₃**: No se puede detectar la producción de OTA por *P. rubens* mediante ELISA luego del tratamiento de muestras especificado por el Proyecto “*Space Biofilms*”.

4. Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional
Producción de OTA	OTA es una micotoxina neurotóxica, inmunosupresora, genotóxica, carcinógena y teratogénica. Es de gran importancia en la actualidad dado que contamina alimentos de consumo humano, principalmente cereales y derivados, bebidas alcohólicas, frutos secos y productos de molienda (Abreu et al., 2011).	Variable dependiente o de respuesta
Gravedad	Tierra 9.8m/s ² y microgravedad	Variable independiente
Tiempo de incubación	10, 15 y 20 días de crecimiento paralelamente, luego de esos tiempos se preservan las muestras en RNA later.	Variable independiente
Tendencia en concentraciones de OTA producida	Absorbancias de OTA en cada tiempo y tipo de gravedad según resultados de ELISA.	Variable dependiente

Cuadro 1. Variables de la investigación y su descripción conceptual y operacional.

B. Control de producción general de OTA

Se desarrolló un control en Tierra bajo el mismo tratamiento que las muestras espaciales. Esto se evaluó antes de las muestras espaciales para determinar si *P. rubens* produce OTA y si era posible detectarla en las condiciones específicas del tratamiento de la muestra (fijación, tiempo y crecimiento). Al confirmar la posibilidad de que el hongo produjera toxinas bajo el efecto de la microgravedad con muestras de prueba, se procedió a la continuación de la experimentación con las muestras llevadas a la Estación Espacial Internacional (EEI).

C. Diseño de muestreo

Se inoculó cepas fúngicas según el protocolo del proyecto *Space Biofilms* de *Bioserve Space Technologies*, que fue descrito en el estudio “Morphology of *Penicillium rubens* Biofilms Formed in Space” publicado por Hupka, M. et al. (2023). Las muestras utilizadas en el presente trabajo fueron las mismas que se utilizaron en el estudio mencionado, en el cual, se detalla explícitamente el tratamiento que recibieron en *Eastern Virginia Medical School (EVMS)*. Sin embargo, también se describe brevemente el tratamiento que recibieron en la presente metodología. Cabe considerar que la presente metodología indica el tratamiento dado a todos los cupones del estudio mencionado, sin embargo, únicamente se utilizaron los de acero inoxidable para la evaluación de presencia de OTA.

D. Preparación de muestras previo al vuelo

1. Preparación y limpieza de laboratorio y material

Para la preparación del material se imprimió y cortó en papel 3M (No. 9731) de menos de 1X1cm, dos copias de las etiquetas con las que se rotuló los cupones y jeringas. Se rotuló todos los cupones excepto los de silicón, dado que se podían rotular hasta terminar todos sus lavados por el tipo de material. Se contó con 120 cupones de 1cm² de acero inoxidable (LOT 5183), 84 de fibra de carbono (LOT 5012), 84 de silicón (LOT 6092), 78 de *MIT Nanograss* (LOT 2022), 84 de cuarzo (LOT 6090), 84 de aluminio 6061 (LOT 4999) y 84 de titanio (LOT 4999). Se rotuló los cupones en la parte de atrás del crecimiento del hongo (parte plana no curva) y se colocaron en platos de pesaje según los mapas o matrices a seguir durante la inoculación en las placas.

Previamente, los tubos o *risers* de silicón (Saint Gobain cat. D1069809) fueron cortados y lavados con *Liquinox* por el equipo de *BioServe* a una altura de 13mm, por lo tanto, únicamente se lavó con agua desionizada y se almacenó en bolsas autoclaveables de 3.5”x9” en grupos de 24 por bolsa.

2. Preparación de PBS

Para la preparación de PBS 1X se lavó un recipiente de vidrio de 1000mL con *Liquinox* y se hizo alrededor de 5 lavados profundos con agua. Se llenó con 400mL de agua desionizada y se disolvió dos tabletas de PBS con cloruro de sodio (Sigma P4417) en una plancha caliente con agitación. Luego se tapó con aluminio y se autoclaveó durante 30min a 121°C. Este se almacenó a 4°C hasta su uso.

3. Agar de papa glucosa (PGA)

Se lavó un Erlenmeyer de 1000mL y un agitador magnético con *Liquinox*. Luego se hizo varios lavados (5 o más) con agua destilada para eliminar todos los restos del

detergente. Según la receta original de ATCC modificada, se pesó 23.40g de agar de glucosa de patata (PGA) (LOT BCBS6247V). Luego se midió 600mL de agua ultrapura y se mezclaron en el Erlenmeyer utilizando una plancha de agitación y calor medio para obtener la solución homogénea. Luego se tapó el recipiente con aluminio y se autoclaveó por 30 min a 121°C en el ciclo de líquidos de la autoclave *Northrop Grumman*. Se distribuyó el agar en 22 placas Petri y se dejó enfriar y solidificar dentro de la campana de flujo laminar con el fin de utilizar 2 para cultivos madre, 2 del vial de *cryostock* y 2 de las placas que tenían 10 días de crecimiento. Este procedimiento para elaborar el agar se repitió cada vez que fueron necesarias placas de PGA, las cuales, se almacenaron a 4°C hasta su uso.

4. Cultivo madre

Se comenzó un cultivo madre a partir del *cryostock* donde se descongeló el tubo con agua tibia o a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 4000rpm durante 3min para condensar los microorganismos en el fondo del tubo y se removió el sobrenadante con pipeta sin tocar el pellet. Luego se resuspendió con 1mL de PBS y se volvió a centrifugar según descrito. Se removió el sobrenadante y repitió el proceso de resuspensión otras tres veces para eliminar por completo el glicerol. En la resuspensión final se removió sobrenadante dejando alrededor de 200uL para luego agregar 100uL del *Cryo P. rubens* en dos placas de PGA dentro de una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad 1. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (alrededor de 24°C) durante 5 días y se almacenaron como cultivo madre a 4°C.

Paralelamente se preparó un cultivo madre a partir del cultivo de la placa original en caso los cultivos madre de *cryostocks* no fueran viables. Para el inicio de los cultivos, dentro de la campana de flujo laminar, se rehidrató con agua destilada un vial de una cepa ATCC de *P. rubens* liofilizado (Biourge 28089), según la hoja de ATCC. Luego se inoculó en platos Petri con PGA e incubó por 8 días a 25°C dentro de un contenedor de poliestireno (el estriado fue en líneas de 6X6 entrelazadas dado que las intersecciones mantienen una densidad de esporas óptima para los fines de este estudio). Previo a la preparación de las muestras de vuelo, se cultivó las cepas del PGA en nuevos platos Petri con PGA. Para esto, se agregó 6mL de PBS a la placa original y se frotó la superficie con un asa estéril desechable (la liberación de esporas en el medio se observa con una coloración más oscura del moho). Luego se pipeteó el PBS con las esporas en tubos cónicos de 15mL, se agitó 30 segundos en *vortex* y se inoculó nuevas placas usando el método de 6X6 líneas entrelazadas. Este procedimiento fue llevado a cabo por el equipo de *Bioserve* en Colorado previo al procesamiento de muestras en EVMS.

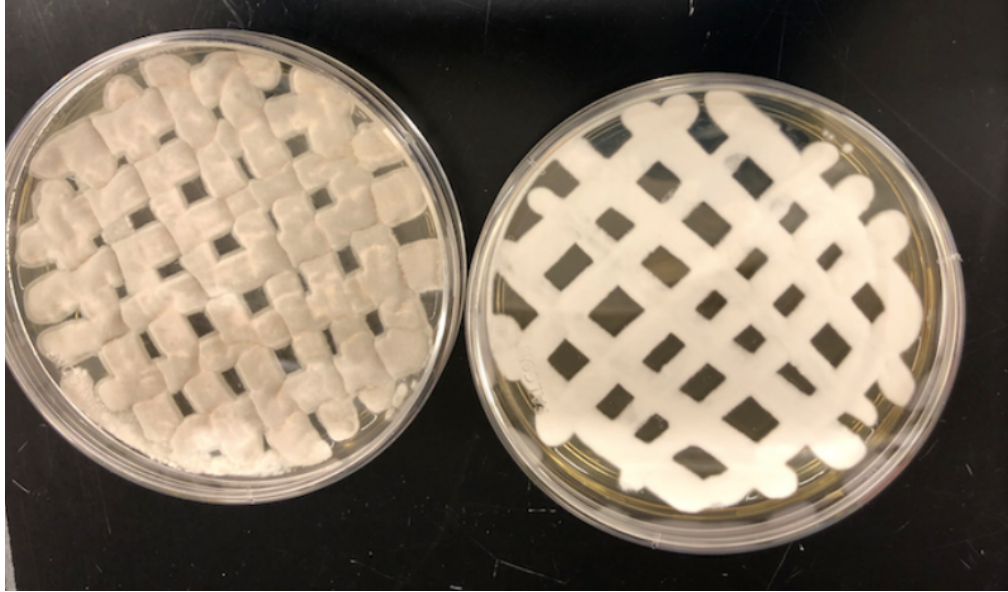


Figura 4. Estriado en 6X6 de cultivo de *P. rubens*. La presente figura muestra el resultado del estriado del cultivo madre de hongo, las intersecciones de los estriados en 6X6 fueron los puntos donde se colocaron los cupones de 1X1cm con PDB para que se adhirieran las esporas.

5. Caldo de dextrosa de patata (PDB)

Se lavó un recipiente de vidrio de 1000mL y un agitador magnético con Liquinox y 5 lavados de agua destilada. Se pesó 12g de dextrosa de patata o papa (batch SLBR0579V) Y 1000mL de agua desionizada. Se agregaron a un Beaker y se mezcló en una plancha caliente con agitación hasta obtener una solución homogénea. Se dejó hervir y luego se filtró usando un papel filtro de 0.2um (Thermo Scientific, Nalgene Cat, 566-0020, LOT 1337579) usando una jeringa adaptable. Se transfirió el medio autoclaveado en el recipiente estéril lavado con su respectiva rotulación y se almacenó a 4°C.

6. Inoculación del hongo en placa

El procedimiento para la inoculación de 18 placas utilizó una colonia inicial de 7-10 días cultivada en agar con el método de 6X6. Dentro de la campana de flujo laminar se agregó 6mL de PBS 1X en el cultivo y se frotó con un asa estéril desechable sobre toda la superficie para liberar las esporas. Luego se trasvasó con pipeta el PBS con esporas a un vial o tubo cónico de 15mL y se agitó en *vortex* durante 30 segundos. Esta solución se utilizó para inocular las 18 placas nuevas con PGA. El método de 6X6 se basa en sumergir un asa estéril desechable en el tubo con PBS y esporas y hacer una primera línea en el agar. Luego volver a tomar muestra del tubo y hacer una segunda línea en el agar, y seguir tomando nuevamente muestra cada vez que se hace una línea hasta llegar a 6 líneas paralelas. Luego se hacen otras 6 líneas paralelas entre ellas, pero perpendiculares a las primeras, de manera que se vea como una malla de 6X6. Las placas se incubaron a temperatura ambiente (alrededor de 24°C) durante 5 días. Es importante tomar en cuenta

que por cada estriado se vuelve a tomar muestra con el asa, no se hace una sola vez porque no se está aislando sino colocando la misma cantidad de muestra en cada rayado.

7. Preparación de PFA AL 4%

El PFA o paraformaldehído según sus siglas en inglés, se utilizó para fijar las muestras de interés morfológico, a diferencia del *RNALater* que se utilizó para preservar muestras de interés transcriptómico. Para su preparación se utilizó un recipiente o bote estéril de 500mL donde se mezcló 80mL de PFA 16% con 240mL de PBS 1X pH 7.2 con el fin de llegar a 320mL de PFA 4%. Luego se transfirió a múltiples recipientes de 50mL con su respectiva rotulación y se almacenó a 4°C.

8. Carga de jeringas de Tierra

La carga de jeringas con PFA y *RNALater* fue distinta para las muestras de Tierra que las enviadas a la EEI. En el caso de Tierra se lavó 156 conexiones *Luer* en *Liquinox* 10% y se hizo lavados con agua destilada. Luego se empacaron en bolsas autoclaveables y se autovlavaron a 121°C durante 30min seguido de un secado de otros 30min. Cada placa de 24 pocillos usa seis jeringas de 5mL de sustancia para fijar o preservar. Se preparó 47 jeringas con PFA 4% y 36 con *RNALater*. Se colocaron las sustancias de llenado en tubos cónicos separados para facilitar su obtención. Dentro de la campana se fue abriendo las jeringas y con precaución se sumergió las puntas en el PFA o *RNALater*, luego se cargó cada jeringa con 4.2mL. Al sacarla, se procedió a posicionarla verticalmente con la punta hacia arriba, se haló más hasta llegar a 5mL. Luego se procedió a eliminar las burbujas dando pequeños golpes, se presionó hasta que el líquido llegó al cuello de la jeringa (4mL), se secó cualquier gota restante y se tapó nuevamente la aguja.

9. Carga de jeringas de vuelo

Las jeringas de vuelo no pueden tener el émbolo de fuera dada la limitación del Espacio durante el vuelo, por lo tanto, se usaron émbolos especiales de *BioServe* que se acomodaron a las jeringas de 5mL. Una vez ensamblados los émbolos dentro de la campana, se esterilizó las agujas 18G 1 ½ (BD *Precision Glide*) y se llevó a cabo el mismo procedimiento de carga y eliminación de burbujas que las jeringas de Tierra y se cubrieron hasta nuevo uso.

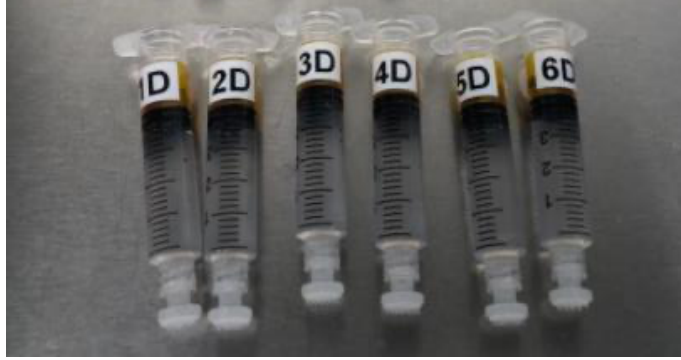


Figura 5. Jeringas de vuelo. La presente figura muestra las jeringas de vuelo cargadas con *RNA later* para mostrar cómo variaron comparado con las jeringas comunes usadas en la Tierra. Estas no se enviaron con las agujas colocadas y el émbolo es corto para que no se presionaran durante el vuelo y procurando ocupar poco espacio.

Fotografía: Pamela Flores, 2022

10. Preparación de placas de 24 pocillos

Para la preparación de las placas de 24 pocillos donde se colocaron los cupones con hongos se comenzó por autoclavar 28 bolsas de *risers* de silicone a 121°C por 30min y 5min de secado. Se llevaron a la campana junto a 26 placas de 24 pocillos y se colocó un *riser* o tubo en cada pocillo para disminuir la capacidad volumétrica de estos. Se mantuvieron estériles hasta la inoculación de los cupones.



Figura 6. Placa de 24 pocillos con risers. La presente figura muestra cómo quedaron las placas de 24 pocillos previo a la inoculación del hongo. Contó con *risers* o cilindros de silicona para disminuir la profundidad de manera que, no se necesitara tanto *RNA later* para llenarlo al momento de inactivar las muestras a los 10, 15 y 20 días de incubación.

Fotografía: Pamela Flores, 2022

11. Preparación de cupones

Los cupones pasaron por varios procesos de desinfección previo a ser inoculados con el hongo. No se llevó a cabo ninguno de estos procedimientos con los cupones de MIT dado que ya se encontraban limpios. Los cupones de silicón se lavaron con el método de *bag wash* donde se colocan dentro de una bolsa plástica sellada con agua y *Liquinox* y se agita fuertemente, haciendo lavados con agua destilada y agitando cada vez hasta notar que no sale más detergente. Se colocó el resto de los cupones en una malla metálica de manera que no se toparan entre sí y se hizo un baño ultrasónico con *Liquinox* por 15min a 30°C. Estratégicamente se comenzó con los cupones de silicón para permitir que se secan a tiempo. Luego del ultrasónico se hizo tres lavados con agua destilada abarcando aproximadamente 30 segundos en cada área para eliminar todo el detergente de los cupones. Seguido de los lavados, se secaron los cupones media hora en horno a 100°C y luego de eso se procedió a rotularlos con una inspección triple para evitar errores según los mapas de rotulación de cupones. Dentro de la campana de flujo laminar se usó platos Petri para lavar cada cara de los cupones con etanol al 70%, colocándolos hacia abajo 15min y nuevamente hacia arriba otros 15min asegurando que el etanol cubriera toda la superficie de estos. Luego se colocaron parados en las orillas de las placas para permitir que escurrieran y se secase el etanol. Para permitir la adhesión de las esporas a los cupones se hizo una última preparación de estos previa a la inoculación. Se colocaron con la curvatura hacia arriba en placas Petri, donde se sumergieron 15min en PDB, esta vez únicamente de este lado y luego se colocaron parados en las orillas para que se secase. La presencia de PDB en el cupón permite brindarle al hongo nutrientes que podrían estar en las estaciones espaciales.

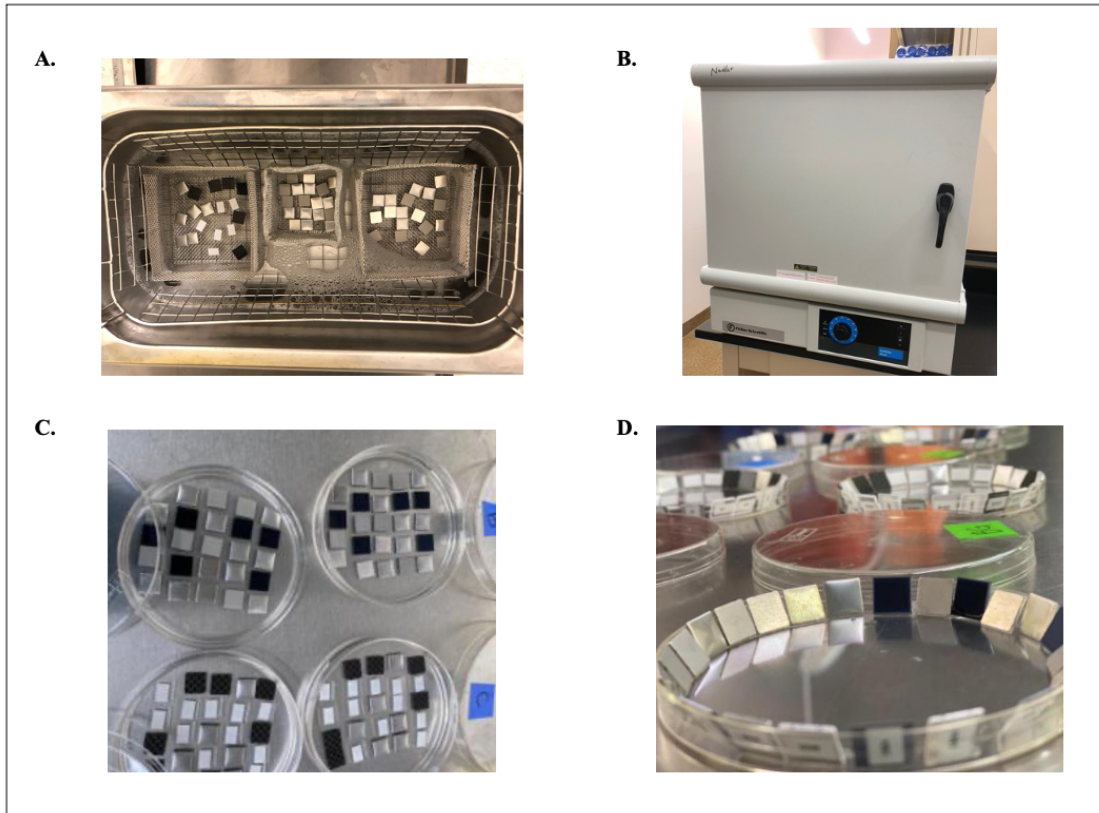


Figura 7. Esterilización y preparación de cupones. Se observan los métodos de limpieza utilizados para la preparación de los cupones de 1X1cm de acero inoxidable. A) Baño ultrasónico. B) Horno. C) Posiciones en placa para sumergirlos en etanol 15 minutos y luego se voltearon y colocaron en nuevas placas con etanol otros 15 minutos. Esta manera de sumergirlos se utilizó también con PDB, pero, únicamente un lado. D) Posicionamiento de cupones para secado luego de lavados con etanol y luego de agregar PDB para permitir que se secura adecuadamente dentro de la campana de flujo laminar.

Fotografías: Pamela Flores, 2022

12. Inoculación de cupones y ensamblaje en placa

Para la inoculación de los cupones se utilizó las nuevas placas de *P. rubens* sembradas 7-10 días antes con el método de 6X6. Todo se trabajó dentro de la campana de flujo laminar y se esterilizó el equipo con etanol cada vez que se manipulaba un cupón distinto. Las características macroscópicas ideales del hongo para saber si tienen una concentración óptima de esporas es viendo si la coloración del moho está gris verdosa y ya no blanca. Una vez seleccionadas las placas a utilizar, se procedió a preparar la cinta de transferencia de doble cara (con pegamento en ambos lados) para agilizar el trabajo, cortando trozos de 1X1cm. De estas, se despegó una esquina de cada lado de la cinta y se fueron utilizando conforme cada cupón lo iba necesitando. Para inocular el cupón con el hongo se pegó un lado de la cinta en el cupón y del otro lado se pegó una pesa de 5g utilizando pinzas. Sutilmente se colocó la cara del cupón en el intercepto de las líneas de crecimiento de hongo y se dejó con la pesa durante 10 segundos para estandarizar la cantidad de esporas que se adhieren. Luego con la ayuda de pinzas se despegó la pesa y se

colocó cada cupón según el mapa en el *riser* correspondiente dentro de la placa de 24 pocillos. Finalmente se colocó una membrana *Breathe Easy Membrane* (Sigma cat. Z380059) cubriendo toda la superficie de las placas asegurando que estuviera bien adherida a las orillas, pero sin tocar los cupones.

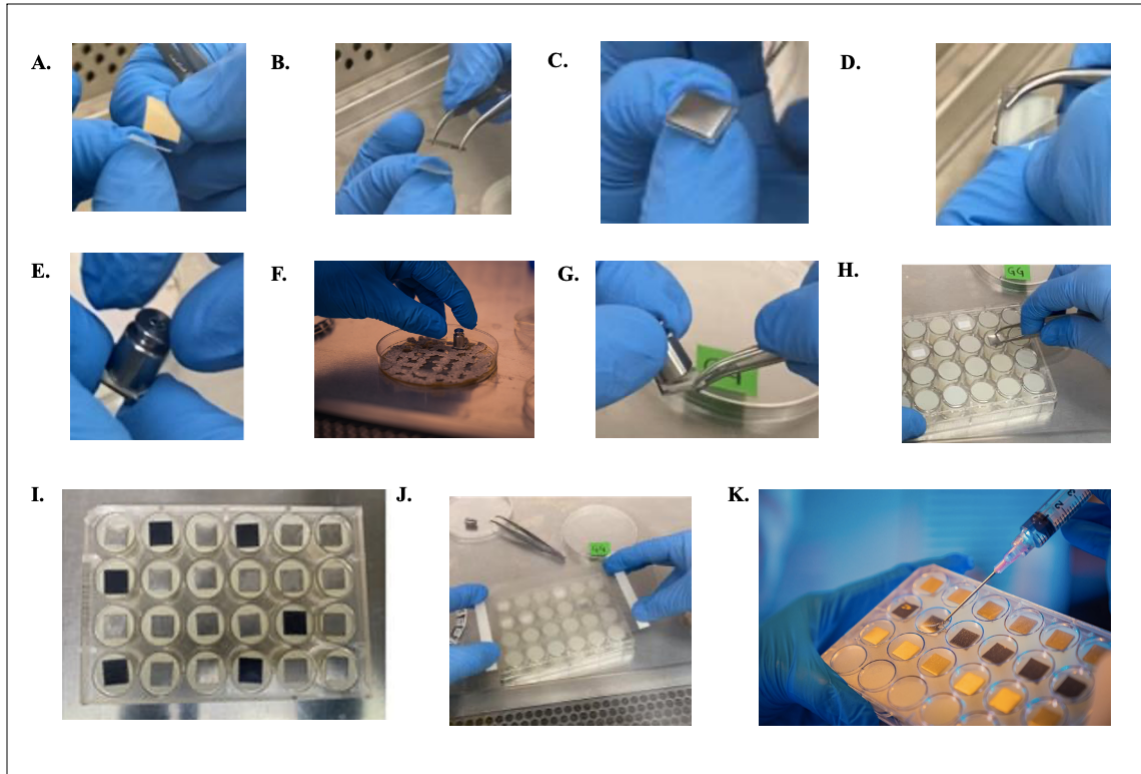


Figura 8. Inoculación de hongo en cupones y preparación de placas. La figura 5 indica paso a paso cómo se inoculó el hongo en cada cupón A-D) La cinta adhesiva de doble cara que se pegó en la parte trasera. E-F) Pesa de 5g que pegó con la cinta en la parte trasera del cupón y se utilizó para ejercer la misma fuerza al tomar las esporas. G) Manipulación adecuada del cupón con pinzas estériles y únicamente tomándolos por las esquinas. H) Colocamiento del cupón con pinzas en el *riser* dentro de un pocillo de la placa de 24. I) Visualización fina de cada muestra independiente dentro de su respectivo pocillo. J) Membrana con la que se taparon las muestras. K) Inyección de *RNAlater* atravesando la membrana. Luego de perforar se colocó encima otra membrana para sellar nuevamente.

Fotografías: Pamela Flores e Ivan Castro (F y K), 2022

13. Activación e inactivación de la incubación

Para terminar la preparación de las placas, luego de cuatro horas se fijó las primeras. La fijación constó de inyectar alrededor de 0.8mL el preservante *RNAlater* o fijador PFA al 4% a través de la membrana y luego colocar encima una membrana nueva. Las muestras de tiempo cero se inyectaron a las 4 horas, luego se inyectó las muestras según les correspondía ya sea a los 10, 15 o 20 días tanto en Tierra como en la EEI. Las placas se almacenaron a 4°C hasta que se enviaron al Espacio en PHABs y se procedió a activarlos agregando 1mL de agua en la tapa de los PHAB. Una vez agregada cualquiera de las sustancias mencionadas se detiene el crecimiento.

E. Detección de OTA mediante ELISA

Para la extracción y detección de OTA se utilizó el kit comercial “AgraQuant® Ochratoxin 2/40 ELISA kit” número de artículo u orden: 10002102/10002103 marca *Romer Labs*® considerando ciertas modificaciones para acoplar el protocolo al tratamiento de las muestras.

1. Curva estándar

Se colocó el número adecuado de pocillos de dilución blancos en un soporte para tiras de micropocillos. Se requirió un pozo de dilución para cada estándar (0, 2, 5, 20 y 40 ppb) o muestra. Asimismo, se colocó un número igual de micropocillos recubiertos con anticuerpos en un soporte para tiras de micropocillos.

2. Extracción

Se realizó varios ensayos de extracción con un inóculo paralelo realizado en Tierra, utilizando controles de granos, la muestra directa (únicamente con PDB), la muestra extraída en metanol al 70% (1:5) y la muestra extraída con metanol al 70% (1:5) con agitación en perlas de vidrio buscando fomentar la liberación de toxinas. Luego se realizó la extracción de las muestras de interés según la guía del kit utilizado, se llevó a cabo una extracción 1:5 (v/v) con metanol al 100%. Dado que se contenía entre 800uL y 1mL de hongo con *RNALater*, se utilizó todo el contenido de cada muestra con 4mL de metanol al 100%. Luego se centrifugaron 3 minutos a temperatura ambiente para utilizar el sobrenadante en la prueba de ELISA.

3. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA)

Se utilizó un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para OTA. Dicho ensayo fue el Ensayo de Ochratoxina AgraQuant® 2/40 orden COKAQ2000/COCKAQ2048 de *Romer Labs*® y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450nm para registrar las absorbancias. Para la lectura de absorbancias se utilizó el *software Biotek gen5* versión 3.11.19 con tipo de lectura Elx800.

4. Análisis estadístico

Se utilizó el *software* del programa *RStudio* para llevar a cabo la exploración de datos y una prueba Shapiro-Wilk que determinó si eran las medias o medianas las que se podían utilizar para comparar las tendencias de OTA bajo gravedad terrestre y microgravedad. Para la regresión lineal y estandarización se utilizó la herramienta *Microsoft Excel* versión 16.78 (23100802) así como la herramienta *Graph Pad Prism 9* versión 9.1.1 (223) para graficar los resultados.

VII. RESULTADOS

A. Validación de extracción, estandarización y datos crudos

Previo a la presente investigación, se hicieron ensayos de métodos de extracción y ELISA con *RNALater* utilizando PDB extra sin alcoholes, metanol 70% (1:5) y otra con metanol al 70% (1:5) con agitación en perlas de vidrio. Al compararlo con los granos (control positivo), se infiere que sí hubo presencia de OTA. Se vio que las muestras sin alcoholes tuvieron concentraciones muy altas, lo cual pudo representar una posible contaminación en el ensayo y no dar una medición de OTA muy confiable. Por otro lado, las muestras suspendidas en metanol obtuvieron mejores resultados y considerables concentraciones de OTA, por lo cual, fue el método utilizado en este caso. Al utilizar la técnica de metanol con perlas de vidrio no solo demostró que pudo ayudar a liberar más toxinas, sino que mantuvo resultados constantes en los duplicados (Fig. 17 anexos). La estandarización de extracción tuvo resultados positivos en cuanto al uso de metanol en proporción 1:5 según el *kit* utilizado. Al estandarizar la extracción, se procedió a extraer de la misma manera las muestras tratadas en *EVMS* y evaluarlas junto a una nueva curva de estándares mediante el mismo *kit* de ELISA según se observan los datos crudos obtenidos en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Datos crudos de absorbancias.

Muestra	Absorbancia		
0ppb	0.896	1.046	NA
2ppb	0.821	0.875	NA
5ppb	0.769	0.99	NA
20ppb	0.407	0.363	NA
40ppb	0.219	0.233	NA
CG13	0.977	1.003	0.956
CG19	1.077	0.993	0.826
DG24	0.882	0.92	0.797
GG18	0.745	0.274	0.256
GG23	0.218	0.245	0.807
HG9	0.586	0.654	0.636
KGI4	0.552	0.236	NA
<i>RNAlater</i>	0.12	NA	NA
KG20	0.218	0.21	0.345
LG4	0.137	0.159	0.126
C13	0.673	0.398	0.493
C19	0.328	0.215	0.214
D24	0.979	0.976	0.902
G18	0.756	0.673	1.041
G23	0.926	0.974	0.863
H9	0.844	0.812	0.432
KI4	0.699	0.718	0.74
K20	0.946	0.539	0.35
L4	0.871	0.213	0.143

El presente cuadro muestra los resultados de absorbancias del ELISA leídas con el *software Biotek gen5* utilizado (sin ningún procesamiento de datos) para los estándares y muestras evaluadas. Las muestras que contienen la letra “G” antes de la última numeración en su correlativo, corresponden a las muestras de Tierra y las otras indican las análogas a dicha numeración enviadas a la EEI. “NA” indica que no aplica debido a que no se contó con dicha muestra.

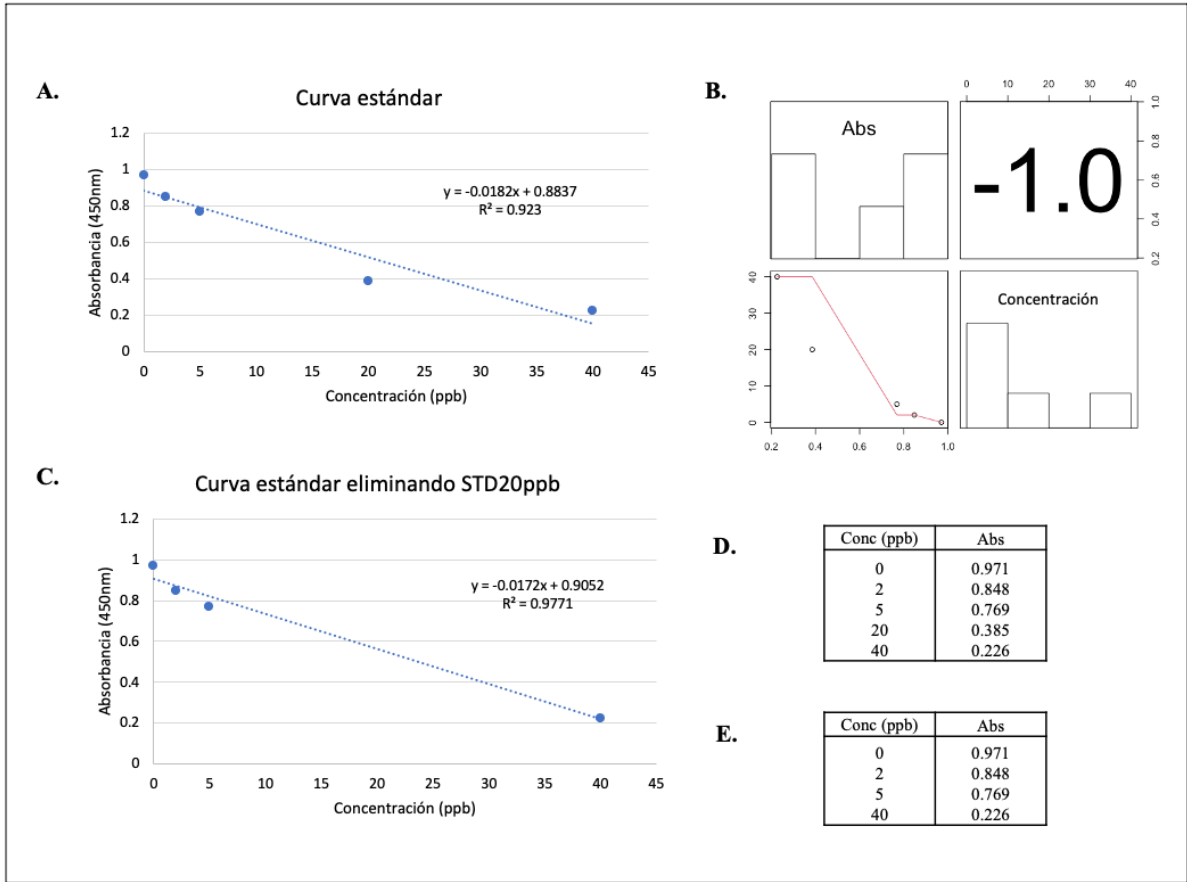


Figura 9. Curvas de calibración de absorbancia a 450nm. La presente figura muestra las curvas de calibración realizadas con los valores promedio de absorbancia obtenidos del duplicado para los estándares. Asimismo, se muestran las ecuaciones de regresión lineal con su coeficiente de correlación al cuadrado (R^2) y los valores exactos en cuadros al lado de las gráficas. En A y D) se presentan los valores obtenidos de todos los estándares con B) la colinealidad entre las variables, y C y E) una regresión tentativa sin tomar en cuenta el estándar de 20ppb, por haber sido levemente atípico en A. Dichos cálculos y gráficas se obtuvieron utilizando el *software Microsoft Excel*® versión 16.78. La correlación de absorbancia y concentración de los estándares presentados en A y D se analizó en *RStudio* versión 4.1.2.

Se buscó una validación de la curva de regresión lineal detallando un análisis de datos de la estadística descriptiva de la curva de estandarización para validar el uso de la ecuación de regresión lineal en el cálculo de la concentración. Se observa que los residuales de las absorbancias obtenidas oscilan entre 1 y -1, a excepción del estándar de 20ppb, donde el residual va más debajo de -1 (Fig.10.A). Dicho valor es el que se aleja de la absorbancia correspondiente en la curva de predicción (Fig.10.B), lo cual, pudo causar la disminución en la elevación de la pendiente en el gráfico de probabilidad normal, donde el cambio en la absorbancia del percentil 50 al 70 es menor a 0.1000, a diferencia de los otros cambios de absorbancia entre percentiles (Fig.10.D y E). Para validar en su totalidad la curva de estandarización y la ecuación de regresión lineal, se buscó un coeficiente de correlación (R^2) de 0.990, lo cual, no se logró, aunque se ajustaran los datos (Fig. 9). Esto indicó que no era válido utilizar ninguna de las concentraciones de OTA en las muestras calculadas con las ecuaciones obtenidas. Sin embargo, el R^2 sí estuvo arriba de 0.9000, por lo cual,

se optó por continuar un análisis generalizado basado en las tendencias que hubo en el comportamiento de absorbancia de OTA ya que, se demostró que la concentración y absorbancia fueron colineales o con una alta correlación tanto en los estándares (Fig.9.B) como en las muestras (Fig.9.B) dado que tuvieron un valor P mayor a 0.7 según las matrices de correlación de variables numéricas obtenidas con *RStudio*.

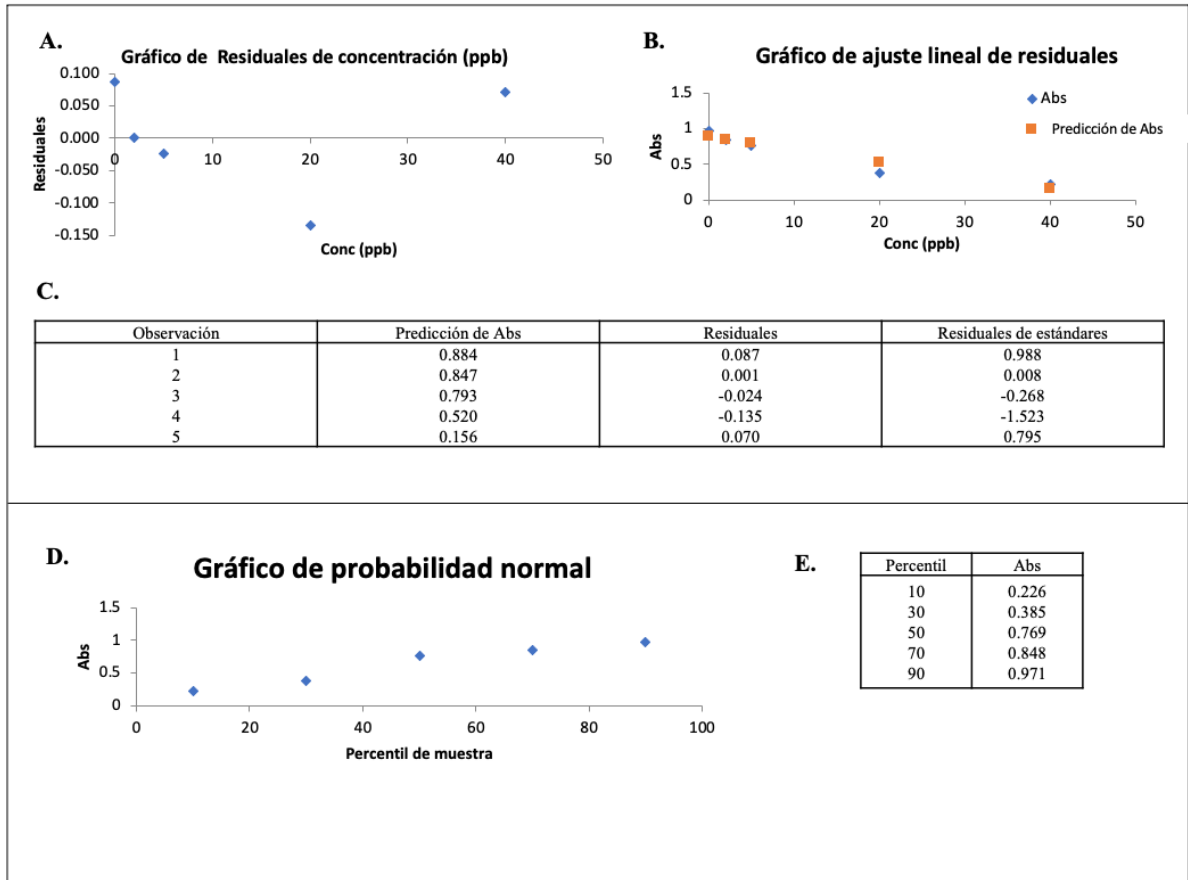


Figura 10. Estadística descriptiva de datos de estandarización. Esta figura muestra el resumen de estadística descriptiva de los datos de estandarización considerando todos los estándares (Fig.9.A) como complemento de lo mostrado en la curva. A) gráfico de los residuales de las absorbancias obtenidas para cada concentración. B) Gráfica de las absorbancias predichas por el modelo comparadas con las obtenidas para cada concentración de estándar. C) Cuadro con los valores de los gráficos A y B descritos detalladamente. D) Gráfico de probabilidad normal de las absorbancias obtenidas en función del percentil de las concentraciones y E) los valores exactos de la gráfica D. Los resultados se obtuvieron con la sección de análisis de datos del *software Microsoft Excel* ® versión 16.78.

B. Procesamiento de datos crudos

La comparación de los resultados W y valor p de normalidad de la prueba Shapiro-Wilk obtenidos con el *software* de programación *RStudio* versión 4.1.2 se muestran en la Fig.11.C y D. Se realizó en paralelo una prueba para para las muestras de *P. rubens* crecidas en la Tierra y para las muestras crecidas bajo microgravedad, siendo 9 muestras por condición. Por ende, la prueba realizada fue para un tamaño de muestra “n” menor a 50

donde el valor W de Tierra fue de 0.88006 y el de la EEI de 0.91502. Por otro lado, el valor p fue de 0.1572 y 0.3526 para Tierra y Espacio respectivamente. Considerando como hipótesis nula que la distribución de las muestras en cada grupo es normal, al tener un valor p mayor a 0.05 en ambos casos, no se rechaza dicha hipótesis, por lo tanto, se distribuyen normalmente. La distribución normal verificó el teorema de adición para los parámetros media y varianza, indicando que de cada conjunto de datos se podía utilizar la media como variable representativa del grupo y no hubo necesidad de utilizar la mediana, lo cual, se realizó para graficar la tendencia de detección de OTA en los siguientes resultados.

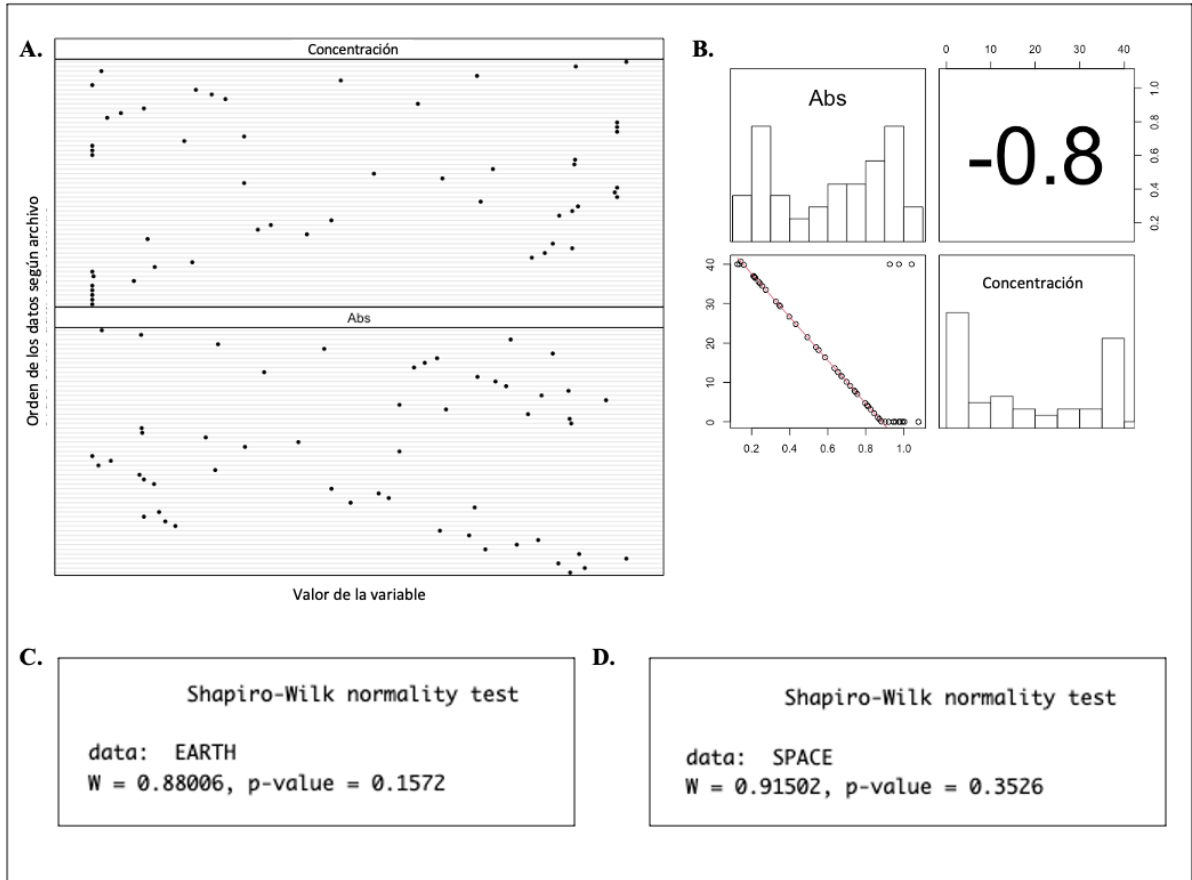


Figura 11. Análisis de distribución y comportamiento de datos crudos de absorbancia de OTA. La figura anterior muestra varias pruebas realizadas con el *software* de programación *RStudio* versión 4.1.2. para identificar el comportamiento y distribución de las absorbancias de OTA obtenidas para las muestras de Tierra y paralelamente para las muestras crecidas bajo microgravedad. A) *Cleveland plot* de distribución de todos los datos de absorbancia obtenidos y las concentraciones calculadas en base a estas y la ecuación de regresión final de la Fig.9. A. B) Colinealidad de las variables numéricas; absorbancias y concentraciones. Los resultados directos como los muestra el programa para las pruebas de normalidad *Shapiro-Wilk* con el valor “p” y “W” se observan para las absorbancias de cada condición de gravedad independiente C) la Tierra y D) Espacio o microgravedad.

Por otro lado, se buscó confirmar la normalidad y descartar agrupaciones de datos fuera de rango con un gráfico de Cleveland utilizando el programa *RStudio* (F.11.A). En dicho gráfico se observó que al no haber espacios vacíos y que los valores o puntos abarcan todo el eje X, se descarta la presencia de valores atípicos o *outliers* que afecten la normalidad de las muestras. Sin embargo, existía un límite de detección según los estándares que fueron desde 0ppb a 40ppb de OTA, por lo tanto, se utilizó las absorbancias

de esas concentraciones de estándares para hacer una limpieza de datos y poder comparar las absorbancias de las muestras que entraban dentro del rango establecido por el *kit* de ELISA utilizado. Dicha limpieza funcionó también para seleccionar el dato más representativa de las pseudoréplicas en cada muestra independiente, por lo tanto, se eliminó manualmente los resultados que se encontraban por arriba de la absorbancia del estándar de 40ppb y por debajo de la absorbancia obtenida del estándar de 0ppb. Hecho lo anterior, al comparar el Cuadro 2 de datos crudos con la Figura 12 de datos limpios por muestra, se observa que se eliminaron las pseudoréplicas y se mantuvo únicamente un dato representativo de cada muestra, dentro del rango establecido por el *kit* y manteniendo el triplicado por cada cantidad de días de incubación dentro de cada condición de gravedad.

C. Tendencias de producción de OTA en la Tierra y bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI)

Luego de establecer una base de datos limpia y confirmar que las muestras fueron comparables (Fig.11 y 12), se pudo observar que las desviaciones entre muestras de los triplicados de los días 15 y 20 de incubación en Tierra y 10 y 20 de incubación en la EEI (Fig.13) son altas. Sin embargo, la cantidad de muestras y espacio fueron limitados por factores no controlables. Por lo tanto, no se descartó ninguna muestra de los triplicados buscando ajustar la desviación, dado que también cumplían con estar dentro del rango de detección establecido por los estándares. Cabe recordar que la prueba de ELISA utilizada fue de medición indirecta, por lo cual, si se observa una alta medición de absorbancia, se infiere teóricamente que habría una concentración baja de OTA. Lo anterior confirma la hipótesis principal de la presente investigación, donde al tener mediciones de absorbancias dentro del rango estandarizado, se confirma que *P. rubens* de alguna manera sí produce OTA al crecer bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional. Asimismo, a pesar de que cada punto fue una muestra independiente, a partir de la Figura 14 se muestran gráficas representativas de la tendencia de absorbancia en OTA como un comportamiento lineal en función del tiempo, dando a representación más visual de cómo se comportaron los hongos en ambos contextos y cómo lo haría un hongo bajo condiciones no controladas.

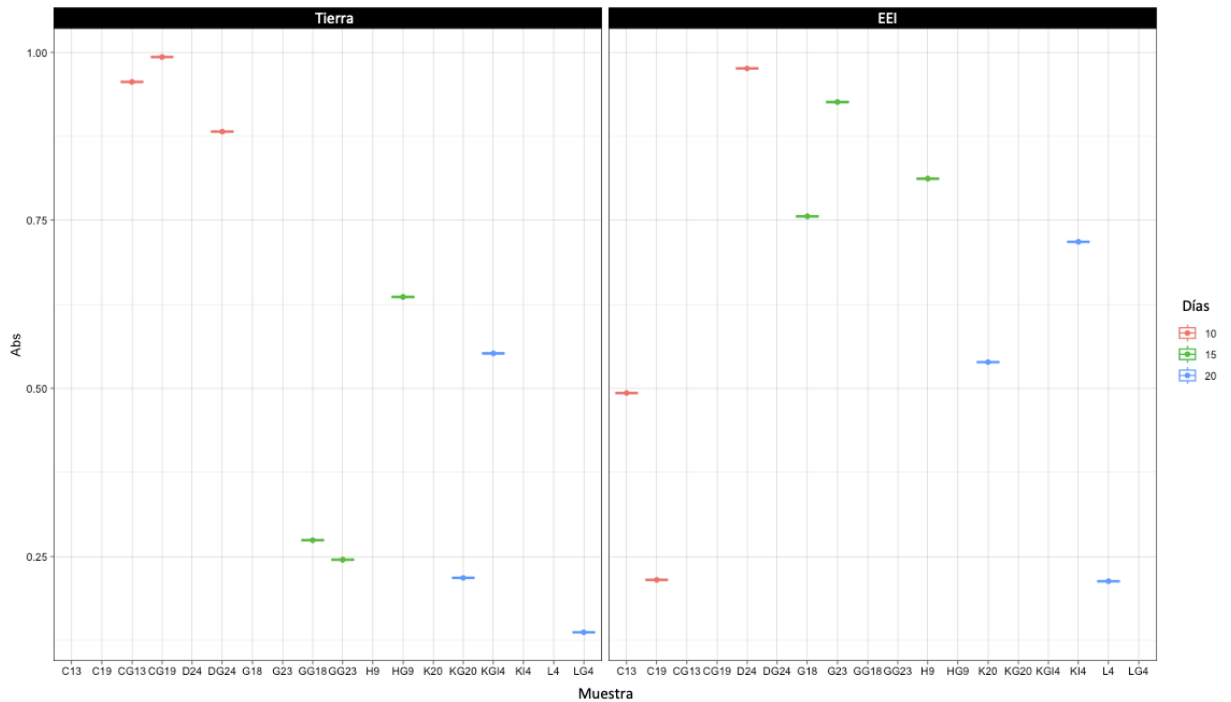


Figura 12. Distribución de absorbancias de OTA corregidas dentro de los límites para cada muestra independiente de hongo. La anterior figura presenta el valor de absorbancia en cada muestra independiente de *P. rubens*, luego de hacer correcciones de las muestras cuyas absorbancias indicaron un límite fuera del rango de los estándares del *kit* de ELISA. Se muestran las muestras de los 10 (rojo), 15 (verde) y 20 (azul) días de incubación tanto para el grupo de gravedad terrestre (izquierda) como el crecido bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI) (derecha). Está se realizó con *RStudio* versión 4.1.2.

Los valores de la Figura 13 se ven representados en la Figura 14 como una función según el tiempo de incubación, resaltando que los puntos se mantienen dentro del área de residuales correspondiente, exceptuando una muestra de los 10 días de incubación crecida bajo microgravedad (Fig.14.B). Se obtuvo un comportamiento inversamente proporcional de absorbancia en función de los días de incubación en las muestras de *P. rubens* crecidas en la Tierra. Es decir, mientras más días de incubación pasó el hongo, menor fue la absorbancia, por lo cual, se infiere que mayor era la concentración de OTA conforme pasaba el tiempo. A pesar de haber dos puntos (uno en el día 15 y otro en el día 20) que se alejan del resto, no cambian la tendencia que se observó en la Tierra (Fig.14.A). Por otro lado, la tendencia de absorbancia de OTA detectada a 450nm por las muestras de *P. rubens* crecidas bajo microgravedad en la EEI, no fue igual ni opuesta a la de Tierra, sino fluctuante. En el día 10 de incubación en el Espacio, la absorbancia es moderadamente baja, a los 15 días tiene un pico donde aumenta y los 20 días vuelve a bajar. En cuestiones de concentración según el comportamiento de absorbancia y no del cálculo directo con la ecuación de regresión, así como viendo la Figura 14. B, se infiere que, al exponer el hongo a microgravedad, este produjo altos niveles de OTA a los 10 días, deja de hacer o disminuyen a las 15 y vuelve a aumentar a los 20.

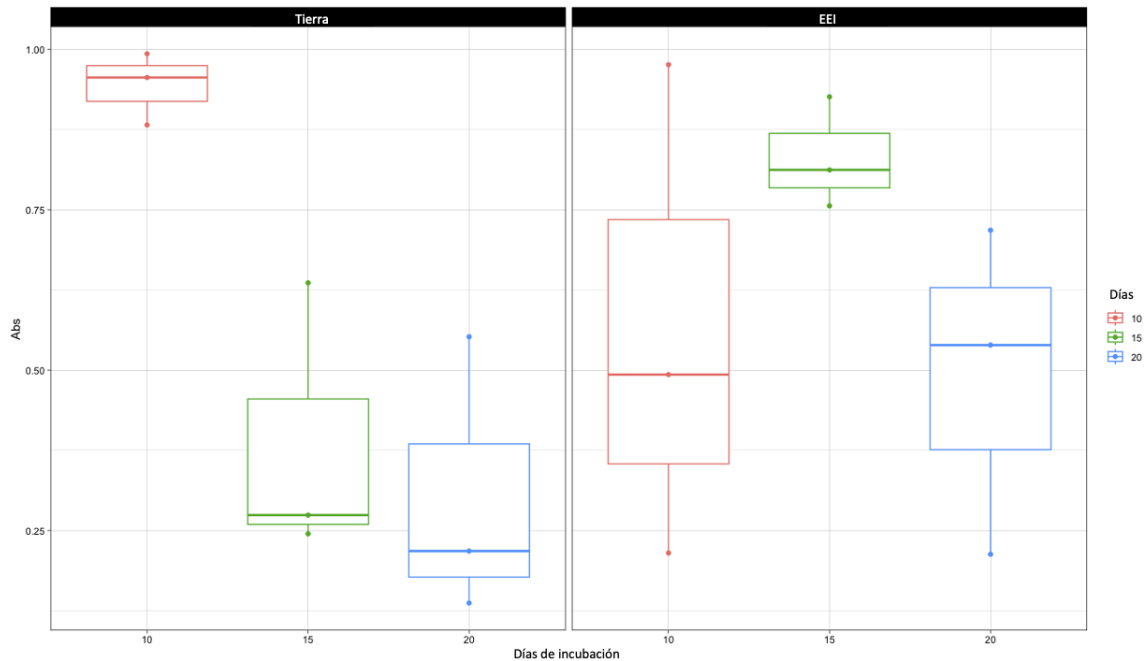


Figura 13. Tendencia de absorbancia de OTA en función de tiempo de incubación en Tierra y EEI de muestras de hongo en triplicado para cada día de incubación. La presente figura muestra los valores independientes de absorbancia obtenidos del triplicado de muestras de absorbancia de OTA luego de 10, 15 y 20 días bajo gravedad terrestre y microgravedad. Se observa el valor específico de cada muestra y la desviación entre los valores representativos de absorbancia por cada día. Está se realizó con *RStudio* versión 4.1.2.

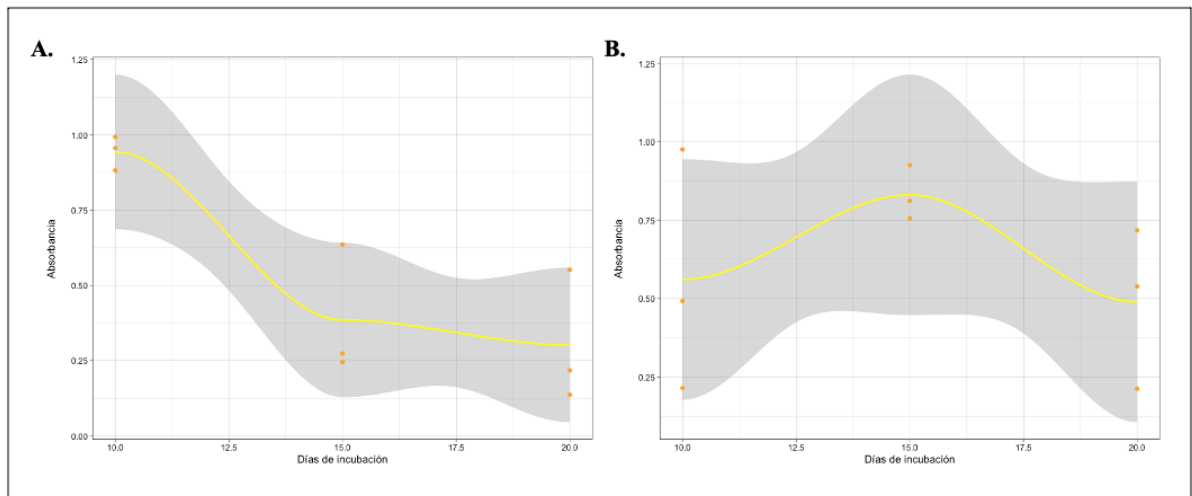


Figura 14. Tendencia de absorbancia de OTA en función de tiempo de incubación en Tierra y EEI de muestras de hongo en triplicado para cada día de incubación. La presente figura muestra la curva (amarillo) de la tendencia que hubo en la absorbancia de OTA luego de 10, 15 y 20 días bajo A) gravedad terrestre y B) microgravedad. Se observa el valor específico de cada muestra como un punto naranja y en gris la desviación estándar por valor absorbancia. Está se realizó con *RStudio* versión 4.1.2.

Al observar este comportamiento en paralelo en la Figura 15 y con valores concretos, se observó que la absorbancia promedio a los 10 días fue de 0.944 y 0.561, a los 15 días fue de 0.385 y 0.831 y a los 20 días 0.302 y 0.490 en la Tierra y EEI respectivamente. Estas absorbancias se mantuvieron dentro del rango de absorbancias de

los estándares mostrados en el Cuadro 2 y al compararlas con las absorbancias promedio de los estándares en la Figura 9.D, se infirió un comportamiento de producción de OTA distinto en cada gravedad. En el caso de Tierra hubo poca o nula producción de OTA a los 10 días, cerca de 20ppb a los 15 días, y entre 20 y 40ppb a los 20 días de incubación, confirmando un aumento en función del tiempo. Al compararlo con los promedios de absorbancia del Espacio o EEI, se considera que hubo una producción de OTA entre 5 y 20ppb a los 10 días de incubación, poca o nula producción a los 10 días y un aumento nuevamente cercano a 20ppb a los 20 días de incubación.

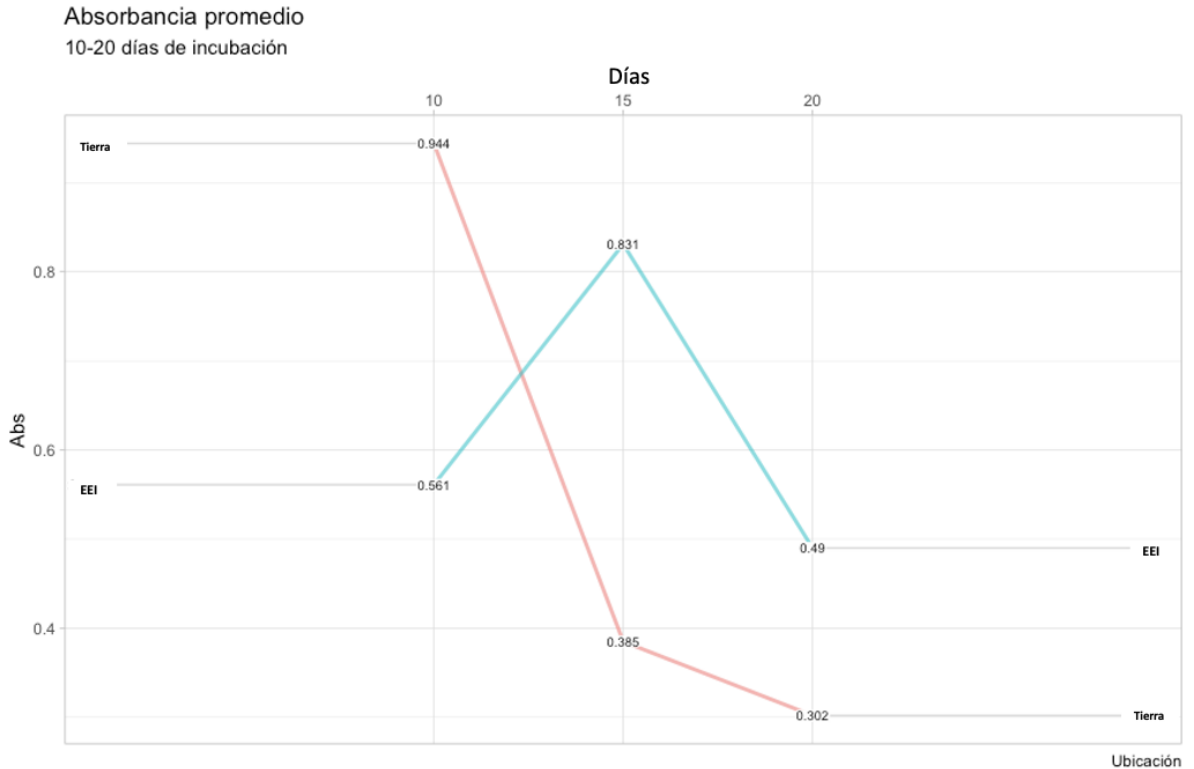


Figura 15. Comparación paralela de las absorbancias promedio de OTA de las muestras de *P. rubens* representativas de la Tierra y Espacio en función de los días de incubación. La gráfica anterior muestra los valores promedio de absorbancia de OTA medida a los 10, 15 y 20 días de incubación de manera paralela en las muestras crecidas en la Tierra (rojo) y bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI) (azul). Está se realizó con *RStudio* versión 4.1.2.

D. Análisis por proporciones

Anteriormente se comparó paralelamente la producción de OTA en cada contexto basado en las absorbancias de los estándares, donde se determinó que *P. rubens* sí produce OTA cuando crece bajo microgravedad y que su comportamiento o tendencia de producción basado en absorbancias, no concentraciones, es distinto a su comportamiento en la Tierra. Sin embargo, para observar qué tan distinto fue en función de los valores de Tierra y no solo de los estándares, se realizó un análisis por proporciones. El primero se basó en la proporción de absorbancia detectada en el día 15 y 20 de incubación en función del día 10 como línea base (Fig.16.A). El día 10 en ambos casos se colocó como línea base de manera independiente con los datos de Tierra y aparte del Espacio o EEI, siendo un valor de 1 o un 100% según la línea punteada. Esto complementó las tendencias observadas anteriormente ya que, se pudo decir numéricamente que la absorbancia de OTA en la Tierra (barras rojas) a los 15 y 20 días de incubación fue menos de 0.5 veces la absorbancia obtenida a los 10 días. Es decir, luego de los 10 días de incubación, la absorbancia de OTA disminuyó a menos del 50% del valor observado en un inicio, indicando que potencialmente la concentración de OTA aumentó 0.50 veces o a más del 50% de lo que hubo en un inicio en la Tierra. Por otro lado, la absorbancia de los hongos incubados en la EEI (barras azules Fig.16.A) a los 15 días fue 1.5 veces la absorbancia obtenida en un inicio a los 10 días y a los 20 días regresó a un valor cercano al que hubo en un inicio, siendo alrededor de 0.9 veces la absorbancia detectada a los 10 días. En otras palabras, la producción de OTA a los 15 días en la EEI disminuyó cerca de un 50% de la producción inicial de los 10 días, y a los 20 días se volvió a producir casi las mismas cantidades de lo que se produjo en un inicio.

Luego de demostrar el comportamiento de producción de OTA en cada contexto basado en los valores detectados del inicio, se buscó observar qué tanto más o qué tanto menos se detectó OTA en la EEI que en la Tierra (Fig.16.B). En este caso, la línea base o punto cero, no fue la absorbancia obtenida en el día 10 sino la absorbancia obtenida para la Tierra en cada día. Nuevamente se tuvo una línea punteada en 1 como el eje del punto cero o de la medición de Tierra de dicho día de incubación. Se obtuvo que, a los 10 días de incubación, en las muestras de la EEI la absorbancia de OTA detectada fue de casi 0.5 veces la de la Tierra. A los 15 días la absorbancia de OTA en la EEI fue más del doble de la detectada en la Tierra y a los 20 días fue de alrededor de 1.5 veces la de la Tierra. En términos de producción de OTA, donde se observa las proporciones inversamente, las muestras de *P. rubens* de la EEI produjeron más a los 10 días que las muestras de Tierra, la producción bajó drásticamente a los 15 días y se comenzó a recuperar a los 20 días basado en lo que se produjo en Tierra en ese momento. Sin embargo, las proporciones de detección y producción de la EEI en función de las muestras de Tierra no fueron nunca cercanas a la línea base, por lo cual, se pudo verificar que el comportamiento en la Tierra fue completamente distinto al de las muestras del Espacio.

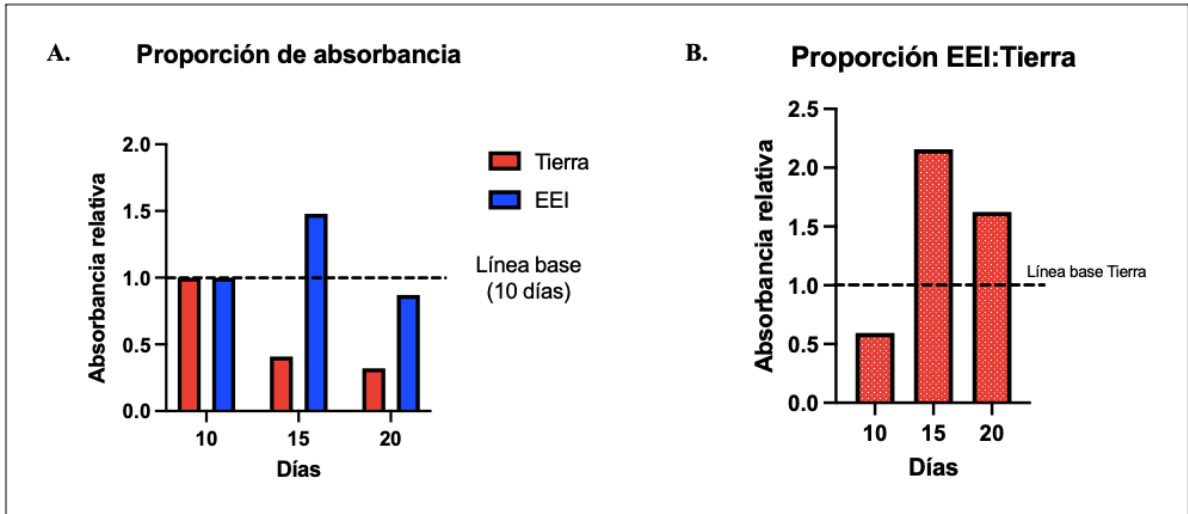


Figura 16. Comparación de absorbancias relativas en función de los días de incubación y de la proporción EEI:Tierra. La figura anterior muestra la proporción de absorbancias relativas de A) ambas gravedades en función de sus valores independientes del día 10 de incubación como punto inicial (dado que no hay medición del día cero) y B) las absorbancias de las muestras de *P. rubens* en la EEI en proporción o teniendo como línea base las absorbancias de las muestras de Tierra en cada día de incubación.

VIII. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A. Toma decisiones para análisis de resultados

Desde la realización de la curva de estandarización se llevó a cabo ciertas modificaciones y toma de decisiones por la limitada disponibilidad de recursos. Entre estas, cabe notar que la medición de los estándares no se llevó a cabo en triplicado sino en duplicado, poniendo una limitante en la validación de la ecuación de regresión lineal. La disponibilidad de equipo y conocimiento práctico para realizar ensayos de inmunoabsorción ligado a enzima tuvieron un impacto fuerte en la toma de decisiones y resultados de esta investigación. Como punto inicial, se puede observar que en la mayoría de los casos hay triplicados de triplicados. Se contaba con tres muestras para los 10 días de incubación en la Tierra, otras tres para los 15 días y otras tres para los 20 días en Tierra. Se contaba con la misma cantidad de muestra para la variable de Microgravedad (muestras análogas a la Tierra no contienen la “G” antes de su numeración en el correlativo). Sin embargo, se evaluó cada una de dichas muestras independientes, tres veces, generando pseudoréplicas en la experimentación dado que la definición de pseudoreplicación conlleva la utilización en cadena varias veces de una misma muestra haciendo que dichos resultados no sean independientes entre ellos (Hurlbert, S. H., 1984).

A pesar de que las pseudoréplicas no son estadísticamente necesarias, en el presente trabajo se llevaron a cabo para asegurar el buen manejo del equipo y la buena técnica de pipeteo durante el análisis de ELISA. Por lo tanto, se garantizó la fiabilidad de los datos y la calidad de pipeteo analizando varias veces cada muestra y limitando errores técnicos que pudieran generar desviación. Por otro lado, se contó con un único *kit* para poder realizar los ensayos de validación del protocolo y la corrida de muestras. Esta fue la razón por la cual no todas las muestras tuvieron triplicados y se realizó una única corrida con estándares en duplicado. Sin embargo, la toma de decisión del número de réplicas por muestra podría optimizarse para futuros análisis ya que, en este caso, de los 64 pozos disponibles, 15 podían utilizarse para un triplicado de estándares y hacer más confiable la curva de estandarización. Tomando en cuenta lo anterior, se pudo haber considerado realizar las pseudoréplicas en duplicado para todas las muestras para seguir llevando a cabo la práctica de pipeteo sin poner en riesgo la estandarización. La limitante de intentar hacer más de una corrida se mantuvo dado que no fue posible evaluar varias veces o en distintos días las muestras porque no se contó con suficientes pocillos para volver a correr estándares, por lo cual, todo se realizó en una corrida. Sin embargo, hubo otros factores que también resultaron ser limitantes para el análisis de resultados mediante la técnica de ELISA, los cuales, se discutirán a continuación.

B. Preservación de la muestra con *RNALater*

Un factor importante que se tomó en cuenta en un último instante fue el uso de *RNALater* para preservar las muestras. El uso de este fue un factor que no podía alterarse ya que, el protocolo de Hupka, M. et al. (2023) estableció ese tratamiento específico con

este o con PFA. El uso de este compuesto en el estudio *Space Biofilms* se basó en preservar unas muestras de esta manera para hacer un análisis de transcriptómica luego y fijar otras en paraformaldehído (PFA) para el análisis de morfología. El uso de *RNAlater* fue una variable que no se podía modificar al momento de preservar las muestras que se evaluarían en este estudio de producción de OTA, por lo tanto, el protocolo se adaptó a dicha condición. Sin embargo, las metodologías comunes de extracción de micotoxinas utilizan cloroformo, acetonitrilo, metanol, etanol, acetona y otros solventes orgánicos (Agriopoulou, S. et al., 2020). Esto dificultó la proyección de qué iba a ocurrir con la ocratixna basado en tres enfoques; si iba a ser factible extraerla, con qué método de preservación era más ideal trabajar y qué efecto tendría este reactivo en la toxina. El *RNAlater* se suele utilizar para preservar el material genético de muestras celulares para posterior análisis molecular ya que, se puede utilizar como alternativa al congelamiento de muestras y al formaldehído, el cual, se utiliza para fijar y resulta una opción muy invasiva y lleva a la degradación del ADN o ARN (Drakulovski, P. et al., 2013). Se puede observar que no hay una relación concreta entre el uso de *RNAlater* o PFA y la extracción o preservación de micotoxinas, siendo la determinación de expresión de genes de ciertas proteínas relacionadas a su producción la única aplicación que relaciona ambos factores (Liu, J. D. et al., 2023).

Lo mencionado anteriormente llevó a que la toma de decisión de cuál preservante utilizar se basara en el efecto que tienen los ingredientes o componentes de estos en las proteínas, ya que no hay estudios que digan explícitamente el efecto que tienen estos reactivos en las micotoxinas o si la estabilidad se mantiene. El formaldehído es comúnmente utilizado para tratar contaminación de alimentos con micotoxinas (Hojnik, N., 2017), por lo cual, se infirió que las muestras preservadas en PFA no podían utilizarse por la posibilidad de degradación o inestabilidad que el formaldehído hubiera causado. Los componentes del *RNAlater* son sulfato de amonio, citrato de sodio y EDTA. En estudios se ha extraído micotoxinas con sulfato de amonio dado que este hace que precipiten, sin embargo, no las degrada (Janli, D. et al., 2017). Hay otras investigaciones donde se ha utilizado citrato de sodio tribásico deshidratado y dibásico sesquihidratado para la extracción de micotoxinas considerando que tampoco las degradan. Desde hace más de dos décadas al analizar mediante cromatografía (TLC), es común la adición de EDTA a los platos de sílica gel de cromatografía para separar más fácil las micotoxinas ácidas y proceder a la detección y cuantificación de estas (tampoco las degrada ya que, el fin de la TLC es detectar la presencia de micotoxinas y cuantificarlas) (Smith, J. E., & Henderson, R. S., 1991). Dicho lo anterior, se pudo observar que a través del comportamiento de los materiales del *RNAlater*, había más probabilidad de poder extraer micotoxinas de las muestras preservadas en este componente, considerando una posible precipitación. En efecto y aunque no se menciona en resultados principales, justo luego de agregar el metanol en las muestras preservadas con *RNAlater* durante la extracción, la solución se tornó blanca y densa. Esto podría considerarse como el precipitado de toxinas mencionado anteriormente, sin embargo, no se consideraron degradadas, por lo cual, se procedió a realizar el ELISA.

El análisis de ELISA sin extracción y medición directa en PDB o la combinación de las tres técnicas evaluadas, generan ambigüedad en la validación dada la alta cantidad

de variables a considerar. Por otro lado, la estabilidad de la técnica de extracción con perlas podría indicar el mejor candidato como mecanismo de extracción más eficiente para el análisis con las muestras del Espacio. Sin embargo, se optó por utilizar únicamente metanol para hacerlo lo más similar posible al protocolo original. Asimismo, es recomendable llevar a cabo de nuevo esta experimentación haciendo un triplicado de ambos tratamientos; solo metanol y metanol con perlas para determinar si ambos pueden a) demostrar nuevamente la producción de la micotoxina por parte del hongo, b) detectar la concentración de la toxina dentro del rango de la curva de calibración y c) mantener resultados constantes en los triplicados. Por otro lado, al no realizar un control sin *RNAlater* para verificar que sí se estaba viendo únicamente OTA, resultó un factor importante y limitante en el resto de la experimentación.

Considerando la influencia del precipitado generado por el *RNAlater* en la absorbancia y las pocas mediciones que se realizaron de este control, no se pudo tomar en cuenta como blanco ni ajustar o normalizar los valores de absorbancia de las muestras preservadas en este medio. En el Cuadro 2, se puede observar que únicamente se tomó una medición de absorbancia del *RNAlater*. La razón fue porque al momento del diseño experimental, no se había considerado y tampoco se sabía que iba a tener un efecto fuerte en las absorbancias. Sin embargo, todas las muestras estaban en este compuesto o medio y el diseño experimental se encontró con dos limitantes. La primera limitante fue un *kit* comercial de ELISA no considera que las muestras estén preservadas en este medio ya que, no es lo común para un análisis de proteínas sino para un análisis de material genético. Por otro lado, el Cuadro 2 indica que se obtuvo una absorbancia del *RNAlater* más baja que el estándar de 40ppb. Esto podría indicar falsos positivos en los resultados dado que, a menor absorbancia implica una mayor concentración de OTA. Como medida temporal y únicamente para direccionar la toma de decisiones en el análisis de resultados, se ajustó los valores de las muestras sumándoles la absorbancia del blanco y seguían demostrando presencia de OTA, por lo cual, se descartó la posibilidad de falsos positivos. Sin embargo, al tener una única medición de *RNAlater*, no se tuvo por certeza que esta fuera representativa del medio, por lo tanto, no se pudo trabajar con los resultados ajustados sin la absorbancia de este medio, por ende, tampoco se pudo trabajar con cantidades numéricas específicas (concentraciones) ya que, la absorbancia del medio sí disminuyó el valor de absorbancia de las muestras. A pesar de presentar estas limitaciones o brechas, siempre se siguió demostrando el objetivo principal del estudio, el cual fue demostrar presencia de OTA en *P. rubens* crecido bajo microgravedad. Por lo tanto, el enfoque tuvo un pivote de cuantitativo a cualitativo, analizando únicamente las tendencias de producción de OTA. Para futuros análisis se recomienda llevar a cabo diluciones de las muestras si se preservan en este medio ya que, demostró estar fuera del rango de las absorbancias de los estándares.

C. Estandarización

La curva de estandarización del ELISA para detectar OTA fue otro aspecto que limitó el enfoque cuantitativo del estudio. Pese a que se buscó validar una curva de 0ppb a 40ppb (Fig.9) y su ecuación de regresión lineal, no se logró el coeficiente de correlación requerido. Tanto la curva original (Fig.9.A) como la ajustada al descartar el valor atípico

en el estándar de 20ppb (Fig.9.C) contaron con un coeficiente de correlación al cuadrado menor a 0.990. El protocolo utilizado para el kit *Romer Labs*® (2000) indicaba que el valor R de la curva de calibración debía estar entre -0.990 y -1.000, lo cual, no se cumplió. Sin embargo, ambas contaron con la pendiente negativa, indicando que sí se cumplió con la proporcionalidad inversa. Asimismo, la curva (Fig.9.C) estuvo cerca, con un coeficiente cuadrado aproximadamente de 0.980 y el OD del estándar 0ppb sí cumplió con ser mayor a 0.5 unidades de absorbancia, por lo tanto, la validez de curva de calibración se encontró en un área gris o ambigua según los criterios que se consideren para validarla. Se realizó únicamente con mediciones en duplicado, por lo cual, hubiera sido funcional realizar más mediciones principalmente porque no se tenía expertís en la técnica. Descartando la posibilidad de uso de la ecuación para analizar basado en concentraciones, se complementó el análisis de la estandarización para poder justificar el uso de las absorbancias en la comparación de resultados y llegar a conclusiones basado en las tendencias, sin dar números de concentraciones específicos. Existe un término llamado *Goodness-of-Fit* (GOF por sus siglas en inglés) o la bondad de ajuste en español, el cual, es factor estadístico que describe qué tan bien un modelo describe ciertas observaciones (Maydeu-Olivares, A. & García-Forero, C., 2010). Cuando se realiza una regresión, los puntos de datos se encuentran dispersos alrededor de la línea ajustada, justo como se observó en la Figura 9 y 10. Para un modelo de regresión ideal, la dispersión debe ser la mínima posible, lo cual, se ve reflejado en los residuales (Fig.10), donde todos se mantienen en un rango de -1 y 1, exceptuando el valor atípico del estándar de 20ppb, el cual, se descartó para ajustar la curva. Cuando la dispersión es uniforme, el modelo se denomina homocedástico. En caso contrario, el modelo es heterocedástico (Mahmood, M.S., 2021).

Cuando la señal medida de los estándares es heterocedástica, varía a lo largo de todo el rango de calibración, teóricamente se suele necesitar un ajuste ponderado. Sin embargo, en la práctica hay cuatro aspectos para definir si es necesario repetirlo según Logue, B. A. (2018); 1) la desviación de la señal no es constante, 2) el rango de calibración es muy amplio o grande, 3) los estándares de calibración están distribuidos equitativamente y 4) el resultado analítico está en el extremo inferior del rango de calibración. Estos criterios se toman en cuenta al analizar el GOF, el cual, ha tenido un gran peso al compararlo con la significancia que tiene el coeficiente de correlación al cuadrado (R^2) como único criterio para validar las curvas de calibración en estudios de química analítica ya que, el GOF engloba varios criterios incluyendo el R^2 . Además, en el estudio de Logue, B. A. (2018) basado en la Precisión residual porcentual para cuantificar la bondad de ajuste de curvas de calibración lineal, el R^2 no define en su totalidad o no es del todo útil para la validación de una técnica al utilizar una curva de calibración analítica ya que, al intentar demostrar la correlación entre resultados desconocidos de dos variables en una escala de 0 a 1, no aplicaría en estándares dado que no son muestras o cantidades aleatorias sino fijas. Por lo tanto, el R^2 no puede ser la única variable que define el GOF de una curva de calibración, aunque, es importante para complementar la información.

Los criterios mencionados anteriormente llevaron a un análisis de otras variables de la curva que podrían mejorar el GOF y apoyar la validez de los resultados. En cuanto al 1, no se realizaron suficientes mediciones para considerar o no considerar una variabilidad o desviación constante. Por otro lado, el rango de calibración no es tan amplio ni están

equitativamente distribuidos (2 y 3) ya que, es un rango de parámetros comunes y los estándares no van con un patrón específico (por ejemplo, de dos en dos, o cinco en cinco). Finalmente, se puede descartar el criterio 4 ya que, se realizó un procesamiento de datos donde se demostró que no había puntos atípicos y agregado a eso se eliminó los puntos fuera del rango de calibración (Fig.9.C). Por lo tanto, ningún valor de las muestras se utilizó fuera de rango. Lo mencionado anteriormente justifica que no fue del todo necesario, aunque podría contribuir, una repetición de la curva de calibración al evaluar las muestras dado que otros criterios de su comportamiento dan veracidad a los datos obtenidos para poder analizar las muestras. Por lo tanto, sí se pudo realizar como mínimo un análisis cualitativo en base a las observaciones.

D. Detección de OTA por *P. rubens*, bajo microgravedad

La distribución de los datos fue normal dado que la prueba Shapiro-Wilk mostró valores “p” mayores a 0.05 (Fig.11) indicando que, para muestras con tamaño menor a 50, la hipótesis nula se acepta, por lo cual, los datos recolectados se distribuyen normalmente (Gupta, A. et al., 2019). En cuanto al gráfico de Cleveland (Fig.11.A) es otra manera de representar la distribución de los datos con cuantiles de manera que, visualmente se pueda identificar comportamientos o distribuciones inusuales en los datos (Martinez, W. L. et al., 2010). Esto permitió utilizar las medias o promedios de cada triplicado para representar el valor de absorbancia por condición gravitacional y día de incubación, de manera que, se pudieran comparar las tendencias en absorbancias e inferir tendencias en producción de OTA. En general, este trabajo buscó demostrar que *P. rubens* produce OTA cuando crece bajo condiciones de microgravedad para anticipar en futuras misiones los potenciales riesgos hacia la salud de los astronautas y la contaminación tanto de alimentos como de cultivos en las estaciones espaciales. Desde 2008 se ha descrito que los hongos que crecen en estaciones espaciales alteran sus propiedades y características, lo cual, puede llevar a un potencial riesgo tanto para habitantes en el Espacio como la Tierra (Dadachova and Casadevall, 2008). Al haber obtenido una lectura de absorbancia con su validez justificada se puede decir que sí se logró demostrar un resultado positivo en la detección de OTA en *P. rubens* crecido en la EEI. Los cultivos de Tierra demostraron que también la producen de manera natural en la Tierra, sin embargo, con comportamientos de producción en función del tiempo totalmente distintos. Esta es la primera vez que se detecta o se hace un acercamiento a los riesgos de esta toxina específica producida por *P. rubens* en la EEI. Sin embargo, no es la primera vez que se detectan metabolitos secundarios en una estación espacial. Kozloysky et al. (2009) identificaron y aislaron la especie que *P. chrysogenum* (ahora llamada *P. rubens*) a partir de la detección de las toxinas PR, roquefortina C, meleagrina y xantocilinas en la Estación Espacial Rusa Mir, lo cual, fue incluso uno de los factores determinantes para sugerir la nueva clasificación de la especie (Zhelifonova, V. P. et al., 2010).

La microgravedad es un factor importante que influye en la vida microbiana y sus procesos metabólicos, siendo una gravedad cercana a cero, pero, no neutralizada, donde

Penicillium sp es de los pocos microorganismos modelos que se han utilizado para estudiar los efectos de la microgravedad en eucariotas (Huang, B. et al., 2018). Sin embargo, la mayoría de los estudios hasta la fecha han sido bajo microgravedad simulada, a diferencia del presente estudio que trabajó con microgravedad real, lo cual, podría alterar la influencia real que tiene esta en las rutas metabólicas ya que, la microgravedad tiene el potencial de dilucidar las bases moleculares de la tolerancia en hongos extremófilos y su adaptabilidad a condiciones espaciales. Aun así, la microgravedad simulada demostró desencadenar la regulación positiva de algunas proteínas involucradas en los procesos metabólicos de los aminoácidos celulares y la regulación negativa de otras (Tesei, D. et al., 2021). Debido a lo anterior y que las condiciones del Espacio son hostiles debido a características como la irradiación, microgravedad y temperaturas extremas, existen cepas aisladas de hongos en las naves y estaciones espaciales como las EEI que han mostrado alteraciones en el metaboloma (Romsdahl, J. et al., 2019) y proteoma (Kordyum, E. L., 2017) luego de una semana de exponerse a los factores estresantes del Espacio (Zakharova et al., 2014). *P. rubens* puede ser alguna de estas y podría incluso incentivar la producción de OTA que es raramente vista en Tierra, pero, previamente comprobada.

En la EEI a los 10 días hubo un pico de producción de OTA por el estrés que pudo haber causado la microgravedad. A los 15 días la producción fue baja o nula, lo cual, se puede correlacionar con las observaciones del estudio de Hupka, M. et al. (2023), en el cual, se observó que a los 15 días el área de superficie que abarcó el *biofilm* de *P. rubens* crecido en acero inoxidable aumentó en la EEI y disminuyó en la Tierra. Al haber un aumento en el área de superficie, implica que las condiciones en ese momento fueron óptimas para que el hongo creciera, lo cual, se correlaciona con la poca producción de OTA ya que, al no haber estrés no hubo necesidad de producir metabolitos secundarios. Sin embargo, al haber abarcado más área del cupón, la disponibilidad de nutrientes se vio limitada. Por lo tanto, a los 20 días la principal causa del estrés de producción de OTA nuevamente fue la falta de nutrientes más que la microgravedad. Por otro lado, en el estudio mencionan que se controló los niveles de oxígeno según la disponibilidad de la EEI, sin embargo, no se realizó un monitoreo o mediciones constantes de oxígeno a lo largo del estudio ya que, no hay datos al respecto y hace del oxígeno una variable con un fuerte efecto en las diferencias observadas de producción de OTA.

El porcentaje de oxígeno atmosférico en la Tierra es de 20.946%, el cual, no varía significativamente al 21.000% disponible de la EEI, sin embargo, en la EEI el porcentaje de exhalación de los astronautas es de 15.300%, considerando la composición atmosférica al nivel del mar en aire limpio sin efectos del clima y temperatura y presión estándar (e-Mission Space Station Alpha, 2019). Al no variar tanto el porcentaje de oxígeno de la EEI y la Tierra, puede que la concentración disponible de oxígeno no haya sido la que tuvo un mayor efecto en la producción de OTA por *P. rubens* dado que se ha visto que hongos que se caracterizan por pudrir la madera y estar expuestos a pocas concentraciones de oxígeno han demostrado adaptarse a pocas concentraciones. Asimismo, a pesar de que se ha visto que hongos patógenos de animales tienden a crecer más lento en una atmósfera con oxígeno suplementado que al aire libre, los hongos patógenos de plantas no se vieron afectados (Reid, I. D., & Seifert, K. A., 1982). Lo anterior indica que considerando que los astronautas consumen cierta proporción de oxígeno de la EEI, puede que *P. rubens* se

adapte a menores concentraciones. Sin embargo, la presión de oxígeno sí tuvo un efecto haciendo que produjera más OTA principalmente los primeros días que experimentó el cambio de ambiente. En el estudio de Scheffer y Livingston (1937) al aumentar la presión parcial de oxígeno ambiental, la proporción de dióxido de carbono producido por unidad de área de micelio aumentó y la conversión adecuada de carbohidratos a biomasa se redujo. Esto es de gran relevancia ya que, podría indicar que la presión de oxígeno pudo causar un estrés que provocó la producción de OTA por el hongo ya que, al no utilizar adecuadamente la glucosa disponible para mejorar su biomasa, pudo haberla utilizado para producir metabolitos secundarios como la OTA.

A pesar de que no existen rutas definidas para la producción de OTA por parte de esta especie, hay factores reguladores de estos mecanismos. Dentro de la potencial ruta del ácido shikímico la OTA deriva de cumarina unida a fenilalanina por un enlace amida. El ácido malónico podría estar involucrado en la formación de precursores como la isocumarina o bien, el acetato derivado de condensación puede transformarse en ambos precursores necesarios para la biosíntesis de OTA (Y. Wang et al., 2016). Esto es alarmante dado que el acetato en distintas formas es uno de los componentes que se monitorea constantemente en el aire de las estaciones espaciales internacionales (tanto la Mir como la EEI) y sigue siendo un componente común, espacialmente cuando hay acoplamiento de partes o exposición (Limerio, T. et al., 2014). Además de la disponibilidad de precursores y estrés de microgravedad, la temperatura también contribuye a la producción de OTA en la EEI dado que, en el estudio de Y. Wang et al. (2016) se muestra que los aislamientos de especies de *Penicillium* se suelen encontrar en áreas más frías que *Aspergillus* y en la EEI el lado que no tiene contacto con el Sol puede llegar a -157°C y necesitan regular constantemente la temperatura, manteniendo ciertos equipos fríos para evitar la condensación de agua que pudiera dañar los sistemas eléctricos (Quora, 2018). La temperatura podría llegar a ser un factor importante ya que, hoy en día empresas como SpaceX confían en el uso de acero inoxidable, material en el cual creció el hongo del presente estudio, para las naves espaciales incluyendo la nave llamada Starship, la cual, se planea que vaya a Marte (World Steel Association, 2022). Cabe reconocer que todo el contexto pudo aportar al comportamiento distinto en las tendencias de producción de OTA por *P. rubens* en el Espacio ya que, al haber crecido bajo acero inoxidable, posiblemente exponerse a temperaturas frías y principalmente la microgravedad, causaron un estrés que conllevó a modificaciones metabólicas en la producción de metabolitos secundarios como la presente micotoxina. Este fue un cambio en una especie basado en una toxina, lo cual, deja abierto un gran espacio a preguntas e investigaciones sobre qué ocurre con las otras especies identificadas en la EEI y cómo se comportan o podrían tratarse a nivel genético, proteómico o metabólico. Cabe mencionar el riesgo que conlleva la diferencia en comportamiento o tendencias de producción observadas ya que, si no se comporta igual a la Tierra, se infiere que no podría tratarse igual. La importancia del presente estudio recae en que al no haber estudios sobre la producción, concentraciones y comportamiento de micotoxinas en las estaciones espaciales (de Middelmeer et al., 2019), no hay investigaciones de cómo tratarlos y a largo plazo conlleva un riesgo ante la salud de los astronautas, ya sea directamente a través de las mucosas o a través de cultivos vegetales que se crecen en las estaciones.

E. Ventajas del método de ELISA para futuras aplicaciones espaciales

Esta investigación se demostró nuevamente que *P. rubens* produjo metabolitos secundarios, justo como se menciona en estudios previos. Sin embargo, hay dos aspectos característicos que enriquecieron y destacaron en esta investigación; la toxina o metabolito secundario detectado y previamente mencionado y el método de detección utilizado. En cuanto al método, se mencionó que este fue mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), cuya sensibilidad es reconocida por ser alta dado que, detecta interacciones entre un complejo antígeno-anticuerpo para detectar macromoléculas como las toxinas (Porstmann, T. et al., 1992). Esta prueba es portátil y rápida, comparado con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), la cual, ha sido una de las alternativas principales para detectar OTA en esta especie de hongo (Zhang et al., 2016). En el estudio comparativo de detección y cuantificación de aflatoxinas llevado a cabo por Beyene, A. M. et al. (2019), no hubo diferencia en la recuperación de las muestras, hubo una correlación positiva entre ambos métodos y se llegó a concluir que ambas pruebas se pueden utilizar para dichos fines sin ninguna diferencia, aunque, el ELISA conlleva ciertas variaciones entre réplicas, haciendo la prueba de preferencia para propósitos de selección en salud. Este enfoque es incluso conveniente para uno de los objetivos presentados en la presente investigación ya que, una prueba de selección tiene como objetivo la detección temprana o vigilancia a cambios en el estilo de vida, para reducir el riesgo de enfermedad o detectarla lo suficientemente temprano para tratarla de manera más efectiva. No son diagnósticos, pero dan una amplia gama de información que puede ayudar a cumplir este objetivo (The Johns Hopkins University, 2023). Se logró adaptar el protocolo de un *kit* comercial de ELISA par detección de OTA en alimentos a los tratamientos aplicados a *P. rubens* crecidos en cupones de acero inoxidable y preservados en *RNALater* según el protocolo del proyecto *Space Biofilms* descrito por Hupka, M. et al. (2023) y descrito brevemente en la presente metodología.

F. Mejoras y siguientes pasos

No se pudo saber si este fue el método ideal para lograr los objetivos dado que no se realizó un análisis comparativo con otras metodologías. La mayor de las limitantes a futuro es encontrar un material en el que se puedan preservar las muestras ya que, las extracciones de micotoxinas suelen ser en metanol o etanol y estos compuestos son volátiles (Vera-Guzmán, A. M. et al., 2009) y la toxicología espacial es estricta, precavida y delicada ante los riesgos de la presencia de compuestos orgánicos volátiles (VOCs por sus siglas en inglés) (Khan-Mayberry, N. et al., 2011). Asimismo, se debe encontrar maneras de normalizar los datos en base al medio de preservación como blanco y aumentar las réplicas para respaldar de mejor manera los resultados. Sin embargo, fue práctico y es replicable, lo cual, da futuro a la investigación espacial considerando optimizar ciertos factores si se diseña desde un inicio con el enfoque de detección de micotoxinas y no con preservantes o fijadores para material genético o. morfología. La optimización de este

protocolo permitirá en futuros estudios, la detección de otras toxinas de la especie crecida bajo microgravedad en distintos materiales o bien, la detección de OTA en otras especies de hongos que crecen en la EEI, buscando siempre anticipar e identificar riesgos microbiológicos en futuras misiones espaciales. Por otro lado, un análisis de transcriptómica complementaría la información recabada en el presente estudio y en futuros ya que, se podría relacionar la expresión de genes con la producción de micotoxinas y establecer rutas definidas que podrían ser útiles como tratamientos para los comportamientos específicos del Espacio según se han hecho en otros estudios de aislamiento y caracterización de hongos de la EEI mediante proteómica (Blachowicz, A. et al., 2019).

Finalmente, al seguir siendo ambigua la definición de una ruta metabólica de producción de OTA en la especie *P. rubens*, se puede usar las bases del presente estudio y las investigaciones que este desencadene para identificar una o varias vías por las cuales el hongo regula su producción de metabolitos secundarios. Se recomienda explorar rutas que previamente se han hipotetizado como influyentes en la producción de OTA por parte de especies del género *Penicillium*. Para entender las posibles rutas destaca la regulación positiva de la familia de proteínas citocromo P450 característica en especies productoras de OTA (Y. Wang et al., 2016). Otra ruta importante es la posibilidad de una ruta alternativa ante la ruta de roquefortina C, micotoxina más común de *P. rubens*, ya que, según El Hajj Assaf et al. (2020), cuando el hongo tiene glucosa, esta es metabolizada a glucosa 6 fosfato, luego a gliceraldehído 3 fosfato y a partir de esta toma la ruta del ácido shikímico para formar aminoácidos aromáticos. Si en el punto anterior no hay una activación de genes para la producción de roquefortina C, se expresa el gen *hdaA*, el cual induce, por lo cual, se propuso una potencial ruta metabólica a partir de la vía propuesta por El Hajj Assaf et al. (2020) (Fig. 18). En esta se agregó el potencial del gen *hdaA* ya que, este activa la producción de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPs por sus siglas en inglés), las cuales producen los péptidos no ribosomales a partir de los aminoácidos aromáticos. Paralelo a esto, el hongo puede transformar cierta cantidad de gliceraldehído 3 fosfato en piruvato, pasando luego a acetyl-CoA y con ayuda de policétido sintetasas (PKSs por sus siglas en inglés), las cuales se activan con la expresión del gen *hdaA*, forman policétidos. Finalmente, la presencia de NRPs y/o PKSs puede formar híbridos de péptidos no ribosomales con policétidos, dentro de los cuales se encuentra la OTA (Fig.18 anexos). Sin embargo, estas consideraciones moleculares fueron más allá de la capacidad experimental del presente trabajo de graduación, por lo tanto, se recomienda continuar estudios que demuestren y respalden la teoría detallada previamente y se busquen medidas correctivas o preventivas de los riesgos que esto puede conllevar.

IX. CONCLUSIONES

Se logró demostrar mediante el método de ELISA con una densidad óptica de 450nm, la producción de OTA de muestras de *P. rubens* crecidas en cupones de acero inoxidable bajo microgravedad en la Estación Espacial Internacional (EEI). El diseño del protocolo conllevó tratamientos y factores externos que limitaron la practicidad y veracidad tanto de la estandarización como de la lectura de absorbancias en los resultados. Sin embargo, variables estadísticas como la bondad de ajuste (GOF) tuvieron más peso sobre la validación del modelo de regresión final estándar que el coeficiente de correlación al cuadrado. Pese a la aceptación del uso de absorbancias para analizar la detección de OTA en las muestras, no se optó por utilizar la ecuación de regresión final estándar para un análisis cuantitativo, de manera que no se hiciera a un lado completamente la significancia de la correlación esperada y presentada en la curva de calibración. Por lo tanto, se logró dar un análisis cualitativo de las tendencias de producción de OTA, donde bajo gravedad terrestre se vio de manera lineal y bajo microgravedad fue fluctuante. Como primer punto, la producción de OTA bajo microgravedad se atribuyó a condiciones favorables como la temperatura, el material (acero inoxidable) y principalmente por cambios proteómicos que se suelen dar por el estrés de la microgravedad. Dichos cambios pudieron ser la causa de la fluctuación en la producción de OTA bajo microgravedad en comparación con las muestras de Tierra, lo cual, indicó que, en caso de causar daño a la salud de los astronautas en un futuro, no puede darse los mismos tratamientos dado que se comportaron de manera distinta. Lo anterior mencionado confirmó el potencial riesgo que estas presentan en futuras misiones espaciales y abrió una nueva rama de investigación en micotoxicología espacial.

Por otro lado, se demostró la factibilidad de aplicar la tecnología de ELISA para la detección de micotoxinas en muestras espaciales, siendo una alternativa rápida y práctica. A pesar de las limitantes de la metodología, se logró el objetivo principal, el cual conllevaba confirmar que esta especie puede producir OTA al exponerse a microgravedad. Esto amplió el espectro de potenciales investigaciones futuras de micotoxinas en el Espacio, el comportamiento de los hongos, las rutas metabólicas y modificaciones en estas y las posibles medidas preventivas o de mitigación que se podrían dar.

X. RECOMENDACIONES

Se requieren futuros estudios para la optimización de factores limitantes como el medio de preservación de las muestras y mejoras en la estandarización con dicho medio, o bien, el uso del medio como blanco para normalizar los valores y poder dar conclusiones cuantitativas.

Las curvas de calibración analíticas pueden ser un factor limitante de la veracidad de datos, por lo cual, se recomienda evaluar la estadística descriptiva y la mayor cantidad de factores posibles de la estandarización al utilizar *kits* comerciales para evitar ambigüedad. Asegurarse de que la estandarización es apta para dar conclusiones cuantitativas. En caso de no entrar en el rango, considerar suficiente espacio y disponibilidad para poder medir y hacer diluciones de las muestras, de manera que entren en el rango de estandarización y se pueda usar la regresión lineal para calcular las concentraciones.

Para futuros análisis, se recomienda realizar más de 30 muestreos para hacerlo estadísticamente significativo ya que, esto permitiría el diseño de un modelo estadístico más complejo que generalice el comportamiento de las micotoxinas en el Espacio.

Finalmente, se recomienda replicar el procedimiento y optimizarlo, analizando transcriptómica o algún indicador genómico, proteómico o metabolómico que pueda complementar la detección de toxinas para delimitar las rutas metabólicas que utiliza el hongo para producir metabolitos secundarios bajo microgravedad.

XI. REFERENCIAS

- AAFA. (2023, 17 enero). *Mold Allergy - Symptoms, Prevention, and Treatment* | AAFA.org. Asthma & Allergy Foundation of America. <https://aafa.org/allergies/types-of-allergies/mold-allergy/>
- Aakash. (2021, 22 marzo). *General Data Protection Regulation(GDPR) Guidelines BYJU'S*. BYJUS. <https://byjus.com/neet/penicillium/>
- Abreu, A. R., Armendáriz, C. R., Fernández, A. Á., & De La Torre, A. H. (2011). La ocratoxina A en alimentos de consumo humano: revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 26(6), 1215-1226. <https://doi.org/10.3305/nh.2011.26.6.5381>
- Agriopoulou, S., Stamatelopoulou, E., & Varzakas, T. (2020). Advances in Analysis and Detection of Major Mycotoxins in Foods. *Foods (Basel, Switzerland)*, 9(4), 518. <https://doi.org/10.3390/foods9040518>
- Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., Al-Ani, L. K. T., López-Arellano, M. E., Gómez-Rodríguez, O., Villar-Luna, E., & Reyes-Guerrero, D. E. (2020). Using Molecular Techniques Applied to Beneficial Microorganisms as Biotechnological Tools for Controlling Agricultural Plant Pathogens and Pest. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 333-349. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-818469-1.00027-4>
- Anthoni, U., Christophersen, C., & Nielsen, P. H. (1999). Naturally Occurring Cyclotryptophans and Cyclotryptamines. En *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* (pp. 163–236). Elsevier.
- Ali, H., Ries, M. I., Nijland, J. G., Lankhorst, P. P., Hankemeier, T., Bovenberg, R. A. L., Vreeken, R. J., & Driessen, A. J. M. (2013). A Branched Biosynthetic Pathway Is Involved in Production of Roquefortine and Related Compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS ONE*, 8(6), e65328. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065328>

- Antigua, L. (2021, 15 septiembre). *Moho Penicillium*. Quesería La Antigua.
<https://queserialaantigua.com/blog/moho-penicillium/>
- Arora, D. K. (2003). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications: 21* (1.^a ed.). CRC Press.
- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. (2020). *Ocratoxina A en los alimentos: evaluación de los riesgos para la salud pública*. <https://www.efsa.europa.eu/es/news/ochratoxin-food-public-health-risks-assessed>
- Avilés-Robles, M., Gómez-Ponce, C., Reséndiz-Sánchez, J., Rodríguez-Tovar, A. V., Ceballos-Bocanegra, A., & Martínez-Rivera, N. (2016). Disseminated Penicilliosis Due to *Penicillium chrysogenum* in a Pediatric Patient with Henoch–Schönlein Syndrome. *International Journal of Infectious Diseases, 51*, 78–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.026>
- Blachowicz, A., Chiang, A. J., Romsdahl, J., Kalkum, M., Wang, C. C. C., & Venkateswaran, K. (2019). Proteomic Characterization of *Aspergillus Fumigatus* Isolated From Air and Surfaces of the International Space Station. *Fungal Genetics and Biology: FG & B, 124*, 39–46.
<https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.01.001>
- Bennett, J. W., & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews, 16*(3), 497-516.
<https://doi.org/10.1128/cmr.16.3.497-516.2003>
- Betancourt, S. L. (2019). Opportunistic Fungal Infection. *Chest Imaging, 209-213*.
<https://doi.org/10.1093/med/9780199858064.003.0037>
- Beyene, A. M., Du, X., E. Schrunck, D., Ensley, S., & Rumbeiha, W. K. (2019). High-performance Liquid Chromatography and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Techniques for Detection and Quantification of Aflatoxin B1 in Feed Samples: A Comparative Study. *BMC Research Notes, 12*(1). <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4538-z>

- CDC. (2022). *Basic Facts about Mold and Dampness | Mold | CDC*. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/mold/faqs.htm>
- Center for Food Safety and Applied Nutrition. (2018). *Guidance for Industry: Action Levels for Poisonous or Deleterious Substances in Human Food and Animal Feed*. U.S. Food and Drug Administration. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/guidance-industry-action-levels-poisonous-or-deleterious-substances-human-food-and-animal-feed>
- Cramer, R. A., & Perfect, J. R. (2009). Recent Advances in Understanding Human Opportunistic Fungal Pathogenesis Mechanisms. *Clinical Mycology*, 15-31. <https://doi.org/10.1016/b978-1-4160-5680-5.00002-5>
- de la Campa, R., Seifert, K., & Miller, J. D. (2007). Toxins From Strains of *Penicillium chrysogenum* Isolated from Buildings and Other Sources. *Mycopathologia*, 163(3), 161–168. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-0091-8>
- de Middeler, G., Leys, N., Sas, B., & de Saeger, S. (2019). Fungi and Mycotoxins in Space—A Review. *Astrobiology*, 19(7), 915–926. <https://doi.org/10.1089/ast.2018.1854>
- Dadachova, E., & Casadevall, A. (2008). Ionizing Radiation: How Fungi Cope, Adapt, and Exploit With the Help of Melanin. *Current Opinion in Microbiology*, 11(6), 525–531. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.09.013>
- Dixon DM, McNeil MM, Cohen ML, Gellin BG, La Montagne JR. (1996) Fungal Infections: A Growing Threat. *Public Health Rep.* 111(3):226-35. PMID: 8643813; PMCID: PMC1381764.
- Drakulovski, P., Locatelli, S., Butel, C., Pion, S., Krasteva, D., Mougdi-Pole, E., Delaporte, E., Peeters, M., & Mallié, M. (2013). Use of RNAlater® as a Preservation Method for Parasitic Coprology Studies in Wild-living Chimpanzees. *Experimental Parasitology*, 135(2), 257–261. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.07.002>

- Dunn, A., & Abadie, L. (2017). *Study Reveals Immune System is Dazed and Confused During Spaceflight*. NASA. <https://www.nasa.gov/content/study-reveals-immune-system-is-dazed-and-confused-during-spaceflight-u/>
- ELISA (2020, abril 6). *Ocratoxina A*. ELIKA Seguridad Alimentaria. <https://seguridadalimentaria.elika.eus/fichas-de-peligros/ocratoxina-a/>
- El Hajj Assaf, C., Zetina-Serrano, C., Tahtah, N., Khoury, A. E., Atoui, A., Oswald, I. P., Puel, O., & Lorber, S. (2020). Regulation of Secondary Metabolism in the Penicillium Genus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9462. <https://doi.org/10.3390/ijms21249462>
- El Khoury, A., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin A: General Overview and Actual Molecular Status. *Toxins*, 2(4), 461-493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- e-Mission Space Station Alpha. (2019). *Chapter 4: Breathing on the space station*. E-missions.net. <http://www.e-missions.net/ssa/CH4-breathingonthespacestation.htm>
- European Society of Neurogastroenterology and Motility-ESNM. (2022). *Agente patógeno*. Gut Microbiota for Health. <https://www.gutmicrobiotaforhealth.com/es/glossary/agente-patogeno/>
- Farrer, R. A., & Fisher, M. C. (2017). Describing Genomic and Epigenomic Traits Underpinning Emerging Fungal Pathogens. *Fungal Phylogenetics and Phylogenomics*, 73-140. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2017.09.009>
- Fukutomi, Y., & Taniguchi, M. (2015). Sensitization to Fungal Allergens: Resolved and Unresolved Issues. *Allergology International*, 64(4), 321-331. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2015.05.007>
- Garza, J. L. (2021). *Mohos productores de micotoxinas*. Unam.mx. Recuperado el 8 de diciembre de 2023, de https://masam.cuautitlan.unam.mx/mohos_toxigenos_unigras/penicillium.html

- Garcia, M. (2021). *Astronaut Shannon Walker works a space agriculture study*. NASA.
<https://www.nasa.gov/image-feature/astronaut-shannon-walker-works-a-space-agriculture-study>
- Garcia-Vidal, C., & Carratalà, J. (2012). Patogenia de la infecció fúngica invasora. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(3), 151-158. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.09.011>
- Girisham, S., Reddy, V. K., Reddy, V. K., & Surekha, M. (2010). *Mycotoxins Problem And Its Management*. Macmillan Publishers.
- Gladieux, P., Byrnes, E., Aguilera, G., Fisher, M., Billmyre, R., Heitman, J., & Giraud, T. (2017). Epidemiology and Evolution of Fungal Pathogens in Plants and Animals. *Genetics and Evolution of Infectious Diseases*, 71-98. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-799942-5.00004-4>
- Greeff-Laubscher, M. R., Beukes, I., Marais, G. J., & Jacobs, K. (2019). Mycotoxin Production by Three Different Toxigenic Fungi Genera on Formulated Abalone Feed and The Effect of an Aquatic Environment On Fumonisin. *Mycology*, 11(2), 105-117.
<https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1604575>
- Gupta, A., Mishra, P., Pandey, C., Singh, U., Sahu, C., & Keshri, A. (2019). Descriptive Statistics and Normality Tests for Statistical Data. *Annals of Cardiac Anaesthesia*, 22(1), 67.
https://doi.org/10.4103/aca.aca_157_18
- Ha, T.H. (2015). Recent Advances for the Detection of Ochratoxin A. *Toxins*, 7(12), 5276-5300.
<https://doi.org/10.3390/toxins7124882>
- Heshmati, A., & Mozaffari Nejad, A. S. (2015). Ochratoxin A in Dried Grapes in Hamadan Province, Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 1–5. <https://doi.org/10.1080/19393210.2015.1074945>
- Heussner, A., & Bingle, L. (2015). Comparative Ochratoxin Toxicity: A Review of the Available Data. *Toxins*, 7(10), 4253-4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>
- Hojnik, N., Cvelbar, U., Tavčar-Kalcher, G., Walsh, J., & Križaj, I. (2017). Mycotoxin Decontamination of Food: Cold Atmospheric Pressure Plasma Versus “Classic” Decontamination. *Toxins*, 9(5), 151.
<https://doi.org/10.3390/toxins9050151>

- Huang, B., Li, D.-G., Huang, Y., & Liu, C.-T. (2018). Effects of Spaceflight and Simulated Microgravity on Microbial Growth and Secondary Metabolism. *Military Medical Research*, 5(1).
<https://doi.org/10.1186/s40779-018-0162-9>
- Hurlbert, S. H. (1984). Pseudoreplication and the Design of Ecological Field Experiments. *Ecological Monographs*, 54(2), 187–211. <https://doi.org/10.2307/1942661>
- Hupka, M., Kedia, R., Schauer, R., Shepard, B., Granados-Presa, M., Vande Hei, M., Flores, P., et al. (2023). Morphology of *Penicillium rubens* Biofilms Formed in Space. *Life*, 13(4), 1001. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/life13041001>
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo - INSST. (2022, 13 diciembre). *Penicillium spp.* Portal INSST. <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/penicillium-spp>
- Janli, D., Purwanto, M. G. M., Artadana, I. B., & Askitosari, T. D. (2017). Extraction and Toxicity Assay of Mycotoxin from Entomopathogenic Fungi Isolate of Kusuma Agrowisata Orchard Batu, Jawa Timur, Indonesia. *KnE life sciences*, 3(5), 63. <https://doi.org/10.18502/kl.v3i5.979>
- Khan-Mayberry, N., James, J. T., Tyl, R., & Lam, C.-W. (2011). Space Toxicology: Protecting Human Health During Space Operations. *International Journal of Toxicology*, 30(1), 3–18.
<https://doi.org/10.1177/1091581810386389>
- Kordyum, E. L., & Chapman, D. K. (2017). Plants and Microgravity: Patterns of Microgravity Effects at the Cellular and Molecular Levels. *Cytology and Genetics*, 51(2), 108–116.
<https://doi.org/10.3103/s0095452717020049>
- Kozlovsky, A. G., Zhelifonova, V. P., & Antipova, T. V. (2009). Secondary Metabolites in the Taxonomy of Fungi of the Subgenus *Penicillium*. *Microbiology*, 78(5), 618–623.
<https://doi.org/10.1134/s0026261709050142>
- Kumar, A., Chadha, S., & Rath, D. (2021). CRISPR-Cas9 System for Functional Genomics of Filamentous Fungi: Applications and Challenges. *Fungi Bio-Prospect in Sustainable Agriculture*,

Environment and Nano-technology, 541-576. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821734-4.00016-2>

Kumar, R. K., Singh, N. K., Balakrishnan, S., Parker, C. W., Raman, K., & Venkateswaran, K. (2022).

Metabolic Modeling of the International Space Station Microbiome Reveals Key Microbial Interactions. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01279-y>

Limero, T., Wallace, W. T., & James, J. T. (2014). Operational Validation of the Air Quality Monitor on the International Space Station.

Liu, J. D., Shanmugasundaram, R., Doupovec, B., Schatzmayr, D., Murugesan, G. R., & Applegate, T. J.

(2023). Short-Term Exposure to Fumonisin and Deoxynivalenol, on Broiler Growth Performance and Cecal Salmonella Load During Experimental Salmonella Enteritidis Infection. *Poultry Science*, 102(6), 102677. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.102677>

Logue, B. A., & Manandhar, E. (2018). Percent Residual Accuracy for Quantifying Goodness-of-Fit of Linear Calibration Curves. *Talanta*, 189, 527–533. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.046>

Mahmood, M. S. (2021, julio 29). *Heteroscedasticity in regression model*. Towards Data Science. <https://towardsdatascience.com/heteroscedasticity-in-regression-model-21d9f5a93e59>

Malavia, D., Crawford, A., & Wilson, D. (2017). Nutritional Immunity and Fungal Pathogenesis.

Microbiology of Metal Ions, 85-103. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2017.01.006>

Margulis, L., & Chapman, M. J. (2009). *Kingdoms & Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life and Earth* (4.^a ed.). Academic Pr.

Martinez, W. L., Martinez, A. R., Solka, J., & Martinez, A. (2010). *Exploratory Data Analysis With MATLAB, Second Edition (2a ed.)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10434>

Maydeu-Olivares, A., & García-Forero, C. (2010). Goodness-of-Fit Testing. En *International Encyclopedia of Education* (pp. 190–196). Elsevier.

- Mendes-Giannini, M. J. S., Soares, C. P., Silva, J. L. M., & Andreotti, P. F. (2005). Interaction of Pathogenic Fungi with Host Cells: Molecular and Cellular Approaches. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 45(3), 383-394. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.05.014>
- Microbiology Society. (2023). *FUNGI*. Recuperado 22 de marzo de 2023, de <https://microbiologysociety.org/why-microbiology-matters/what-is-microbiology/fungi.html>
- Nakamura, K., Okada, M., Yoneda, M., Takamoto, S., Nakade, Y., Tamori, K., Aso, K., & Makino, I. (2001). Macrophage Inflammatory Protein-2 Induced by TNF- α Plays a Pivotal Role in Concanavalin A-Induced Liver Injury in Mice. *Journal of Hepatology*, 35(2), 217–224. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(01\)00109-x](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(01)00109-x)
- NASA (2016) *Learning launchers: On the defensive -- immune*. https://www.nasa.gov/audience/foreducators/stem-on-station/learning_launchers_immune
- National Center for Families Learning. (2019). *What Do Astronauts Eat In Space?* Wonderopolis. Recuperado 2 de diciembre de 2021, de <https://www.wonderopolis.org/wonder/what-do-astronauts-eat-in-space>
- Neelesh, T. (2016, 24 agosto). *Penicillium: Description, Structure and Reproduction*. Biology Discussion. <https://www.biologydiscussion.com/fungi/penicillium-description-structure-and-reproduction/46564>
- Olavario, D. (2019). *Planet of the Grapes: How Red Wine Will Help Astronauts on a Mission*. Euronews. Recuperado 2 de diciembre de 2021, de <https://www.euronews.com/2019/07/30/planet-of-the-grapes-how-red-wine-will-help-astronauts-on-a-mission>
- Ozdemir, O. (2015). Molds and Respiratory Allergy - Part 1. *MOJ Immunology*, 2(3). <https://doi.org/10.15406/moji.2015.02.00045>
- Pappas, P. G. (2010). Opportunistic Fungi: A View to the Future. *The American Journal of the Medical Sciences*, 340(3), 253-257. <https://doi.org/10.1097/maj.0b013e3181e99c88>

- Perrone, G., Logrieco, A., & Frisvad, J. (2017). Comments on “Screening and Identification of Novel Ochratoxin A-Producing Fungi from Grapes. *Toxins* 2016, 8, 333”—In Reporting Ochratoxin A Production from Strains of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces*. *Toxins*, 9(2), 65.
<https://doi.org/10.3390/toxins9020065>
- Porstmann, T., & Kiessig, S. T. (1992). Enzyme Immunoassay Techniques an Overview. *Journal of Immunological Methods*, 150(1–2), 5–21. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(92\)90061-w](https://doi.org/10.1016/0022-1759(92)90061-w)
- Pfohl-Leszkowicz, A., & Manderville, R. A. (2007). Ochratoxin A: An Overview on Toxicity and Carcinogenicity in Animals and Humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(1), 61-99.
<https://doi.org/10.1002/mnfr.200600137>
- Quora. (2018). *How Difficult is it to Keep the Space Station Warm?* Forbes.
<https://www.forbes.com/sites/quora/2018/10/24/how-difficult-is-it-to-keep-the-space-station-warm/?sh=575472ef4af7>
- Rahimi, E., & Shakerian, A. (2013). Ochratoxin A in Dried Figs, Raisings, Apricots, Dates on Iranian Retail Market. *Health*, 05(12), 2077–2080. <https://doi.org/10.4236/health.2013.512282>
- Rai, M., & Bridge, P. D. (2010). *Chemistry and Biosynthesis of Ochratoxins*. En Applied Mycology (pp. 43–45). Cabi. <https://cutt.ly/kTdguV7>
- Reid, I. D., & Seifert, K. A. (1982). Effect of an Atmosphere of Oxygen on Growth, Respiration, and Lignin Degradation by White-Rot Fungi. *Canadian Journal of Botany. Journal Canadien de Botanique*, 60(3), 252–260. <https://doi.org/10.1139/b82-034>
- Revankar, S. G. (2023). *Miscellaneous Opportunistic Fungi*. MSD Manual Professional Edition.
<https://www.msmanuals.com/professional/infectious-diseases/fungi/miscellaneous-opportunistic-fungi>

- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J., & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and Toxicodynamics of Ochratoxin A, an Update. *Chemico-Biological Interactions*, 159(1), 18-46.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.10.106>
- Santa Cruz Biotechnology, Inc. (2015). *Roquefortine C* | CAS 58735-64-1. SCBT - Santa Cruz Biotechnology. Recuperado 18 de octubre de 2021, de <https://www.scbt.com/p/roquefortine-c-58735-64-1>
- Santomartino, R., Aversch, N. J. H., Bhuiyan, M., Cockell, C. S., Colangelo, J., Gumulya, Y., Lehner, B., Lopez-Ayala, I., McMahon, S., Mohanty, A., Santa Maria, S. R., Urbaniak, C., Volger, R., Yang, J., & Zea, L. (2023). Toward Sustainable Space Exploration: a Roadmap for Harnessing the Power of Microorganisms. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37070-2>
- Satoh, K., Yamazaki, T., Furukawa, S., Mukai, C., & Makimura, K. (2021). Identification of Fungi Isolated from Astronaut Nasal and Pharyngeal Smears and Saliva. *Microbiology and Immunology*, 65(2), 89-94. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12872>
- Scheffer, T. C., & B. E. Livingston. (1937). *Relation of Oxygen Pressure and Temperature to Growth and Carbondioxide Production in the Fungus Polystictus Versicolor*. *Am. J. Bot.* 24: 109-119.
- Simões, M. F., & Antunes, A. (2021). Microbial Pathogenicity in Space. *Pathogens*, 10(4), 450.
<https://doi.org/10.3390/pathogens10040450>
- Staab, J., & Wong, B. (2014). *Fungal Infections, Systemic*. Reference Module in Biomedical Sciences.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.02399-0>
- St-Pierre, D. (2023). *Penicillium spp.* Institut National de Santé Publique Du Québec.
<https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/penicillium-spp>
- Tatum, M. (2021). *Scientists are Growing Grapes in Space to Save Earth's Wine Supply*. WIRED UK.
Recuperado 2 de diciembre de 2021, de <https://www.wired.co.uk/article/space-grapes-wine-mutations>

- Universidad de Buenos Aires. (2022). *Herbario Virtual Fitopatología | Cátedra de Fitopatología - FAUBA*. Herbario Virtual Fitopatología. https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=319
- Vedantu. (2022, 29 noviembre). *Penicillium*. VEDANTU. <https://www.vedantu.com/neet/penicillium>
- Wang, L., Wang, Q., Wang, S., Cai, R., Yuan, Y., Yue, T., & Wang, Z. (2022). Bio-control on the Contamination of Ochratoxin A in Food: Current Research and Future Prospects. *Current Research in Food Science*, 5, 1539-1549. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2022.09.007>
- Wang, Y., Wang, L., Liu, F., Wang, Q., Selvaraj, J., Xing, F., Zhao, Y., & Liu, Y. (2016). Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms. *Toxins*, 8(3), 83. <https://doi.org/10.3390/toxins8030083>
- Wearing, J. (2010). *Fungi: Mushrooms, Toadstools, Molds, Yeasts, and Other Fungi (Illustrated)*. Crabtree Publishing Company.
- WHO. (2018). *Mycotoxins*. World Health Organization. Recuperado 14 de marzo de 2023, de <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
- Zhang, X., Li, Y., Wang, H., Gu, X., Zheng, X., Wang, Y., Diao, J., Peng, Y., & Zhang, H. (2016). Screening and Identification of Novel Ochratoxin A-Producing Fungi from Grapes. *Toxins*, 8(11), 333. <https://doi.org/10.3390/toxins8110333>

XII. ANEXOS

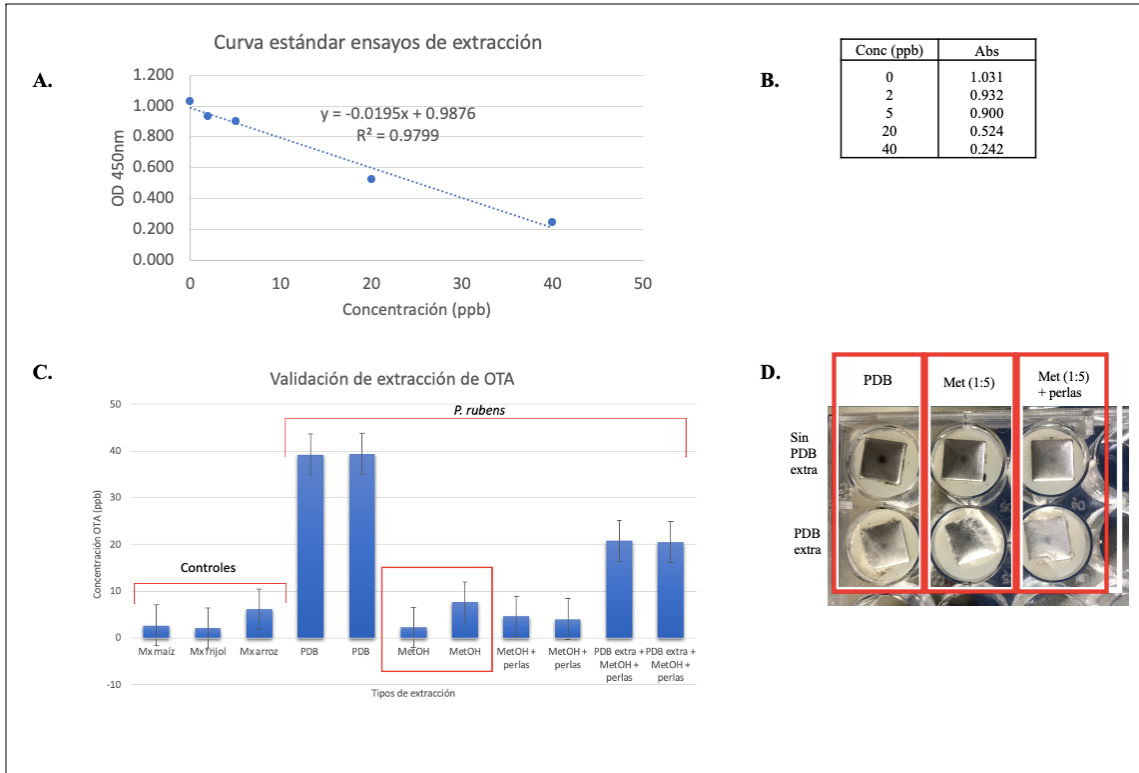


Figura 17. Ensayos de extracción de OTA en *RNAlater* con distintos tratamientos. La presente figura muestra los ensayos realizados con hongos cultivados paralelamente a la experimentación, donde se hizo las primeras pruebas de lectura de OTA con el *kit* comercial de ELISA en distintos tipos de extracción de los hongos preservados en *RNAlater*. Se muestra A) la curva estándar para realizar los cálculos, B) los valores de absorbancia promedio de estándares, C) las concentraciones de cada tratamiento y controles positivos de maíz, frijol y arroz y D) los cultivos en duplicado según su extracción en PDB (sin tratamiento), metanol al 70% (1:5) y metanol al 70 (1:5) con agitación en perlas, se evaluó la extracción combinada agregando PDB extra para evaluar todas las combinaciones posibles.

Cuadro 3. Mapa de placa de 96 pocillos para realización de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0	0	DG24	GG23	KG20	C19	G18	KI4
B	2	2	DG24	HG9	KG20	C19	G23	KI4
C	5	5	DG24	HG9	LG4	C19	G23	K20
D	20	20	GG18	HG9	LG4	D24	G23	K20
E	40	40	GG18	KGI4	LG4	D24	H9	K20
F	CG13	CG19	GG18	KGI4	C13	D24	H9	L4
G	CG13	CG19	GG23	<i>RNAlater</i>	C13	G18	H9	L4
H	CG13	CG19	GG23	KG20	C13	G18	KI4	L4

El presente cuadro indica el mapa de muestreo de la placa de 96 pozos utilizada para realizar el ELISA de detección de OTA marca *Romer Labs*®. Las muestras 0-40 indican los estándares con concentraciones de 0 a 40ppb. Las casillas de la columna 1 a 4 contienen los identificadores de cada muestra crecida bajo gravedad terrestre y el medio de preservación *RNAlater*. De la columna 5 a la 8 se encontraron las casillas con los identificadores de las muestras incubadas paralelamente bajo microgravedad.

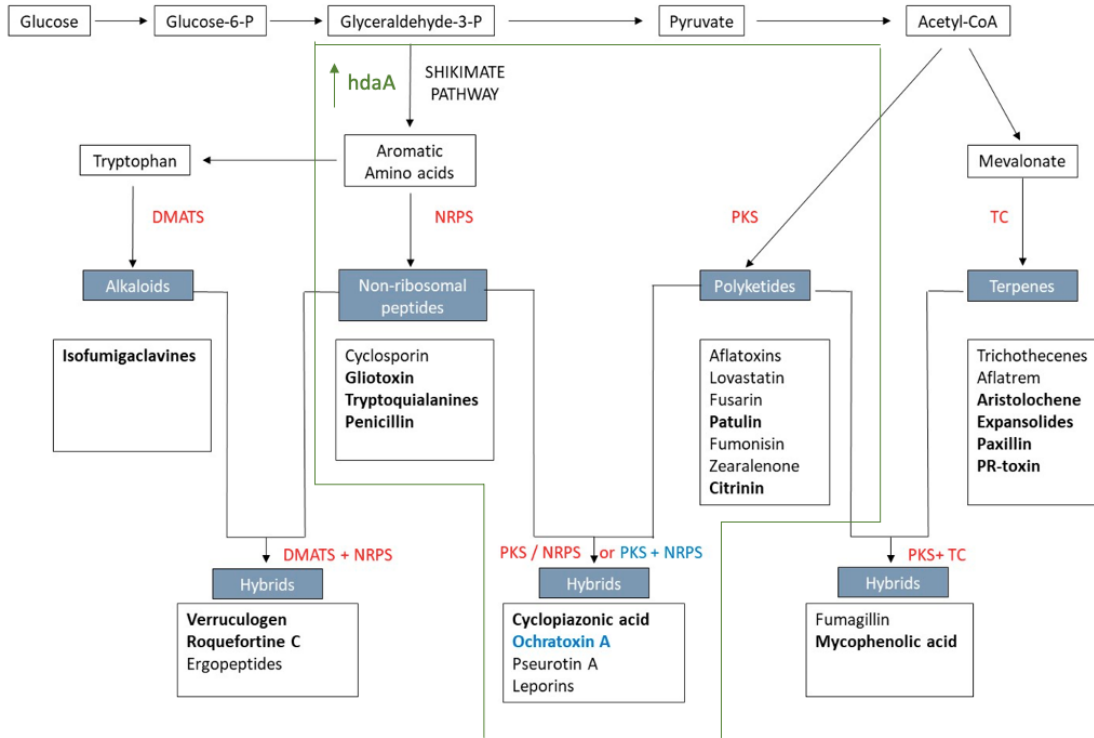


Figura 18. Propuestas de rutas biosintéticas de producción de OTA presentada por El Hajj Assaf et al. (2020) modificada con influencia de gen *hdaA*. La presente figura muestra la representación gráfica de las rutas que podría tomar *P. rubens* para producir OTA según mencionado en la sección de mejoras y siguientes pasos en el análisis de resultados. Los derechos de autor pertenecen a la Figura 1 del estudio de Hajj Assaf et al. (2020) titulado “Regulation of Secondary Metabolism in the *Penicillium* Genus”.

A. Script utilizado para análisis estadístico y generación de gráficas en RStudio (versión 4.1.2.)

```
# Bases de datos tidyDB
library(readxl)
library(ggplot2)
library(psych)
library(lattice)

# CURVA DE CALIBRACIÓN
Std = read_excel("~/Desktop/SPACE BIOFILMS OTA/standardCurve.xlsx")
View(Std)
str(Std)

# ambos son numéricos, no hay que transformar variables (se puede proceder a obtener
# regresión lineal)

source('~Downloads/biometria/HighstatLibV10-1.R')

MyVar = c ("Abs", "Concentration")
pairs(Std[,MyVar2], lower.panel = panel.smooth,
      upper.panel = panel.cor,
      diag.panel = panel.hist)

# RESULTADOS Y ANÁLISIS DE DATOS
ELISAOTA = read_excel("~/Desktop/SPACE BIOFILMS OTA/ELISAOTA.xlsx")
View(ELISAOTA)
str(ELISAOTA)

#1. transformar caracteres a factor
ELISAOTA$Location = as.factor(ELISAOTA$Location)
ELISAOTA$Days = as.factor(ELISAOTA$Days)
ELISAOTA$Sample = as.factor(ELISAOTA$Sample)
str(ELISAOTA)

# limpieza de datos manual (<0 se consideraron cero y >40ppb se consideraron máxima
concentración)

# 2. IDENTIFICAR outliers en variables numericas
```

```

# cleveland plot
MyVar2 <- c("Abs","Concentration")
dotplot(as.matrix(ELISAOTA[,MyVar]), groups=FALSE,
        strip = strip.custom(bg = 'white',
                              par.strip.text = list(cex = 0.8)),
        scales = list(x = list(relation = "free"),
                      y = list(relation = "free"),
                      draw = FALSE),
        col=1, cex =0.5, pch = 16,
        xlab = "Value of the variable",
        ylab = "Order of the data from text file")

```

Todos los puntos abarcan el eje X, no se ven agrupaciones de outliers

3. CORRELACIÓN ENTRE CONCENTRACIÓN Y ABSORBANCIA PARA IDENTIFICAR SI DEBO ANALIZAR AMBAS

O PUEDO ANALIZAR ÚNICAMENTE UNA. Determinar si variables numericas son colineales

```

MyVar3 = c ("Abs","Concentration")
pairs(ELISAOTA[,MyVar2], lower.panel = panel.smooth,
      upper.panel = panel.cor,
      diag.panel = panel.hist)

```

4. ANOVAS para determinar normalidad de datos

ANOVAS

NOTA: Se realizó pseudoréplicas (tres mediciones para una sola muestra), por lo tanto, se utilizará

solo una de las mediciones por muestra independiente ya que, tener tres no resulta significativo para

realizar un ANOVA por muestra. Se limpiará manual dichos datos para obtener una medición por muestra independiente.

documento limpio: ELISAOTAclean, metodo de selección del dato del triplicado (mediana)

```
ELISAOTAclean = read_excel("~/Desktop/SPACE BIOFILMS
```

```
OTA/ELISAOTAclean.xlsx")
```

```
ELISAOTAclean$Location = as.factor(ELISAOTAclean$Location)
```

```
ELISAOTAclean$Days = as.factor(ELISAOTAclean$Days)
```

```

ELISAOTAclean$Sample = as.factor(ELISAOTAclean$Sample)
View(ELISAOTAclean)
str(ELISAOTAclean)

# Se hará Prueba de Shapiro-Wilk (n pequeño [n<=50]) para Tierra y aparte para el
Espacio

# H0: La distribución es normal
# H1: La distribución no es normal
# si p> 0.05 no se rechaza H0 y la distribución es normal
# https://bookdown.org/dietrichson/metodos-cuantitativos/test-de-normalidad.html

# para EARTH
EARTH <- c(0.956,0.993,0.882,0.274, 0.245,0.636,0.552,0.218,0.137)
SPACE <- c(0.493,0.215,0.976,0.756,0.926,0.812,0.718,0.539,0.213)
shapiro.test(EARTH)
shapiro.test(SPACE)
# Shapiro-Wilk normality test EARTH

#data: EARTH
#W = 0.88006, p-value = 0.1572

#      Shapiro-Wilk normality test SPACE

#data: SPACE
# W = 0.91502, p-value = 0.3526

#En ambos casos, los conjuntos de datos se distribuyen normalmente (Tierra y Espacio),
por lo
# tanto, se utilizará el promedio de datos por día y condición de gravedad para comparar
las
# tendencias.

# GRÁFICAS Y VISUALIZACIÓN DE COMPARACIÓN DE TENDENCIAS

# Tierra:
ELISAOTAearth = read_excel("~/Desktop/SPACE BIOFILMS
OTA/ELISAOTAearth.xlsx")

```

```

ggplot(ELISAOTAearth, aes( x = Days, y = Abs)) +
  geom_smooth(col = "yellow") +
  geom_point(col = "orange")+
  labs(x = "Días de incubación", y = "Absorbancia\n") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1))+
  theme_linedraw()

# Espacio:
ELISAOTAspace = read_excel("~/Desktop/SPACE BIOFILMS
OTA/ELISAOTAspace.xlsx")

ggplot(ELISAOTAspace, aes( x = Days, y = Abs)) +
  geom_smooth(col = "yellow") +
  geom_point(col = "orange")+
  labs(x = "Días de incubación", y = "Absorbancia\n") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1))+
  theme_linedraw()

# ambos
# distribucion de datos por muestra "limpios"/corregidos
bp2 <- ggplot(ELISAOTAclean,aes(x = Sample, y = Abs,col = Days))+
  geom_boxplot()+
  geom_point() +
  theme_linedraw()
bp2 + facet_grid(. ~ Location)

# distribucion de datos por dia "limpios"/corregidos
bp3 <- ggplot(ELISAOTAclean,aes(x = Days, y = Abs,col = Days))+
  geom_boxplot()+
  geom_point() +
  theme_linedraw()
bp3 + facet_grid(. ~ Location)

# TODO EN PROMEDIO, VISTA DE TENDENCIAS EN PARALELO

ELISAOTAave = read_excel("~/Desktop/SPACE BIOFILMS
OTA/ELISAOTAave.xlsx")
ELISAOTAave$Location = as.factor(ELISAOTAave$Location)

```

```

ELISAOTAave$Days = as.factor(ELISAOTAave$Days)

library(CGPfunctions)

newggslopegraph(ELISAOTAave, Days,Abs, Location,
  Title = "Absorbancia promedio",
  SubTitle = "10-20 días de incubación",
  Caption = "Ubicación") +
  theme_light() +
  theme(legend.position = "none")

# ultimo plot de comparacion con variable Days as numeric
ELISAOTAclean$Days = as.numeric(ELISAOTAclean$Days)

ggplot(ELISAOTAclean, aes( x = Days, y = Abs)) +
  geom_smooth(col = "yellow") +
  geom_point(col = "orange")+
  labs(x = "Días de incubación", y = "Absorbancia\n") +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 90, hjust = 1))+
  theme_linedraw()+
  facet_grid(. ~ Location)

```