

23  
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

"RELACION DEL HONGO Fusarium spp. CON LA  
LEUCOENCEFALOMALACIA Y EDEMA CEREBRAL DE  
EQUINOS"

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A :  
**ESTEBAN BARCENAS GUEVARA**

México, D. F.

1988



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## ÍNDICE

	Páginas
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	iii
Índice.....	v
Lista de figuras.....	vii
Lista de tablas.....	xi
RESUMEN.....	xii
SUMMARY.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
Antecedentes históricos.....	3
Síntomas.....	6
Etiología.....	12
Distribución geográfica de encefalopatías de equinos en México.....	20
OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
1.-Medios de cultivo.....	29
a)Medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA).....	31
b)Medio de Papa-Sucrosa-Agar (PSA).....	31
c)Medio de Cloruro de Potasio-Agar (KCl-Agar).....	32
2.-Aislamiento de micoflora.....	33
3.-Multiplicación del inóculo.....	34
a)Reproducción del hongo en arroz.....	35
4.-Determinación del hongo.....	36
a)Estudio de microscopía óptica.....	37
b)Estudio de microscopía electrónica de barrido.....	38

	Páginas
5.-Extracción de micotoxinas.....	39
a)Método de Stoloff, <u>et al</u> .....	40
b)Método de Thomas, <u>et al</u> .....	43
c)Método de Romer.....	46
6.-Identificación de micotoxinas.....	50
a)Cromatografía de capa fina.....	50
b)Espectroscopía infrarroja.....	54
c)Espectrometría de masas.....	56
7.-Estudio microscópico de cerebros de equinos.....	58
a)Estudio de microscopía electrónica de transmisión...	58
8.-Prueba biológica.....	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	65
Aislamiento del hongo.....	65
Determinación del hongo.....	69
Extracción de micotoxinas.....	77
Identificación de micotoxinas.....	79
Estudio microscópico de cerebros.....	91
Prueba biológica.....	93
CONCLUSIONES.....	99
LITERATURA CITADA.....	101

## LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1.-Cavidades formadas por la necrosis licuefactiva (malacia) en la sustancia blanca del cerebro.....	8
Figura 2.-Necrosis licuefactiva (malacia) y hemorragias en la sustancia blanca del cerebro.....	8
Figura 3.-Desintegración de la sustancia blanca del cerebro 63x.....	10
Figura 4.-Vaso sanguíneo congestionado con infiltración perivascular de leucocitos en leucoencefalomalacia. 400x.....	10
Figura 5.-Infiltración de líquido intersticial (edema) y presencia de células de edema citotóxico. 400x.....	11
Figura 6.-Micotoxinas producidas por el género <u>Fusarium</u> .....	15
Figura 7.-Distribución geográfica de brotes de encefalopatías reportadas en México durante el periodo de 1979-87.....	25
Figura 8.-Número de brotes de encefalopatías reportadas en México durante el periodo de 1979-87.....	27
Figura 9.-Método de Stoloff, <u>et al.</u> , 1971.....	42
Figura 10.-Método de Thomas, <u>et al.</u> , 1975.....	45
Figura 11.-Método de Romer, 1986.....	49
Figura 12.-Cromatografía de capa fina.....	52
Figura 13.-Prueba biológica.....	64

Figura 14.- <u>Fusarium moniliforme</u> : a,b, cadenas de microconidios; c, monofiálides; d, macroconidios y microconidios (a 505x, b-d 1250x).....	71
Figura 15.- <u>Fusarium moniliforme</u> : a, microconidios; b,c, monofiálides (a 4000x, b 1600x, c 4400x).....	72
Figura 16.- <u>Fusarium subglutinans</u> : a,b, macroconidios y microconidios; monofiálides y polifiálides (a 1250x, b 505x, c,d 1250x).....	73
Figura 17.- <u>Fusarium subglutinans</u> : microconidios. 4400x.....	74
Figura 18.- <u>Fusarium anthophilum</u> : a,b, monofiálides; c, microconidios (ovales y piri formes); d, polifiálides (a,b 1250x, c,d 505x).....	75
Figura 19.- <u>Fusarium anthophilum</u> : a, monofiálides; b, microconidios (a 1800x, b 1800x).....	76
Figura 20.-Espectrograma infrarrojo de la micotoxina Diacetoxiscirpenol (DAS) (tricoteceno tipo A).....	84
Figura 21.-Espectrograma infrarrojo de la micotoxina T-2 (tricoteceno tipo A).....	84
Figura 22.-Espectrograma infrarrojo de la micotoxina Deoxinivalenol (DON) (tricoteceno tipo B).....	85

- Figura 23.-Espectrograma infrarrojo de la mico  
toxina correspondiente a la mancha  
desconocida # 1 de la muestra 2 que  
causó brotes de leucoencefalomalacia  
equina..... 87
- Figura 24.-Espectrograma infrarrojo de la mico  
toxina correspondiente a la mancha  
desconocida # 1 de la muestra 4 que  
causó brotes de edema cerebral equino..... 87
- Figura 25.-Espectrograma infrarrojo de la mico  
toxina correspondiente a la mancha  
desconocida # 2 de la muestra 2 que  
causó brotes de leucoencefalomalacia  
equina..... 88
- Figura 26.-Espectrograma infrarrojo de la mico  
toxina correspondiente a la mancha  
desconocida # 2 de la muestra 4 que  
causó brotes de edema cerebral equino..... 88
- Figura 27.-Edema cerebral: hinchamiento de miel  
lina con degeneración de axones y  
disociación de los grupos mielínicos  
con pérdida de la morfología de áreas  
de la sustancia blanca..... 92
- Figura 28.-Leucoencefalomalacia: pérdida de las  
áreas de la sustancia blanca, presen  
cia de conglomerados amorfos y frag-  
mentos de mielina..... 92
- Figura 29.-Cerebro sano: presencia de mielina  
y axones..... 92
- Figura 30.-Resultados de la Prueba Biológica..... 96
- Figura 31.-Caballo postrado después de dosif  
ficar con la micotoxina aislada  
de alimento contaminado que causó  
Edema cerebral..... 97

Figura 32.-Infiltración de líquido intersticial  
(Edema) y presencia de astrogía  
reactiva (astrocitos). 400x..... 98

Figura 33.-Vaso sanguíneo congestionado y zonas  
hemorrágicas. 400x..... 98

## LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1.-Especies toxígenas de <u>Fusarium</u> .....	14
Tabla 2.-Relación de las fusariotoxinas conocidas.....	16
Tabla 3.-Número de brotes de encefalopatías de equinos reportadas en México durante el periodo de 1979 a 1987.....	21
Tabla 4.-Número de brotes de encefalopatías de equinos reportados en México durante el periodo de 1979 a 1987.....	26
Tabla 5.-Muestras de cereal contaminado pro cedente de lugares donde se repor taron brotes de encefalopatías en equinos.....	30
Tabla 6.-Resultados de la micoflora encontrada en las muestras de alimento contaminado.....	66
Tabla 7.-Micotoxinas obtenidas en la cromatogra fía de capa fina.....	78
Tabla 8.-Comparación de los valores de Rf obtenidos de los tricotecenos utilizados con otros valores.....	81

## RESUMEN

La leucoencefalomalacia (LEM) y el edema cerebral (EC) - son enfermedades que se presentan en caballos y asnos, ori ginándose como resultado de una micotoxicosis debida al consumo de alimento, principalmente maíz, contaminado con los hongos Fusarium moniliforme y F. subglutinans. El factor patológico que origina estas enfermedades es una micotoxina producida por estos hongos, la cual se desconoce así como el mecanismo por el cual ésta induce el proceso patológico. Algunos investigadores (Kriek et al., 1981 y Marasas et al., 1984) han llegado a mencionar a la micotoxina moniliformina como el posible factor patológico.

Las lesiones causadas por esta enfermedad son a nivel de sistema nervioso central, principalmente en el cerebro, y se caracterizan por un reblandecimiento debido a necrosis de tipo licuefactivo (malacia) limitado a la substancia blanca de uno o ambos hemisferios cerebrales con la consecuente formación de cavidades en el cerebro. Este proceso degenerativo va acompañado de congestión, hemorragias, ede ma (infiltración de líquido intersticial) y lesiones en ór ganos viscerales, principalmente en el hígado.

En México, en los últimos años, se ha incrementado el núme ro de reportes de brotes de encefalopatías de equinos, los cuales han sido atribuidos a virus sin considerar una toxi cosis. El presente trabajo se realizó para identificar los hongos y sus micotoxinas como posibles responsables de es tas enfermedades.

Se analizó la micoflora de alimento contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de LEM y EC equi-

no. Se utilizaron 3 medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Papa-Sucrosa-Agar (PSA) y Cloruro de Potasio-Agar (KCl-Agar) para inducir esporulación en el hongo. Se realizó la extracción de micotoxinas por las técnicas de Stoff et al. (1971), Thomas et al. (1975) y Romer (1986).

Se identificaron las micotoxinas por cromatografía de capa fina (CCF), espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas. Además se realizó la prueba biológica en caballos y asnos utilizando las micotoxinas encontradas.

En el análisis e identificación de la micoflora se encontró a los hongos Fusarium moniliforme, F. subglutinans y F. anthophilum.

Se encontraron 2 tipos de micotoxinas que correspondieron a tricotecenos tipo B en la CCF. Esta técnica y la espectroscopía infrarroja mostraron la presencia de la micotoxina Fusarenona X. Los estudios realizados mostraron que la micotoxina moniliformina no está implicada en estas enfermedades.

Se encontró a la micotoxina identificada como Fusarenona X responsable del edema cerebral equino al reproducir la enfermedad en la prueba biológica, al dosificar con esta micotoxina.

No se pudo reproducir la leucoencefalomalacia en la prueba biológica.

## SUMMARY

The leucoencephalomalacia (LEM) and brain edema (BE) are diseases present in horses and donkeys, which originate as a result of a mycotoxicoses due to the consumption of feed, mainly corn, contaminated with the fungi Fusarium moniliforme and F. subglutinans. The pathological factor that originates these diseases is a mycotoxin produced by these fungi, this mycotoxin is unknown as well as the mechanism of the pathological process. Some researchers (Kriek et al., 1981 and Marasas et al., 1984) have mentioned moniliformin as the possible pathological factor.

The lesions caused by this disease are in the central nervous system, mainly brain, and are characterized by a softening due to a liquid necrosis (malacia) in the white substance of one or both brain hemispheres, with the conductive formation of caves in the brain. This degenerative process goes together with congestion, hemorrhages, edema (infiltration of interstitial liquid) and lesions in the viscera, mainly in liver.

In Mexico, the number of reports of equine encephalopathies have increased in the last years, and had been attributed to a virus without consideration of a toxin.

This work was made to identify the fungi and their mycotoxins, that are responsible of these diseases and to show the presence of them in Mexico.

The mycoflora of the contaminated feed that caused LEM and BE were analyzed. Three different culture media were used, Potato-dextrose-agar (PDA), Potato-sucrose-agar (PSA) and Potassium Chloride-agar (KCl medium) to induce

esporulation of the fungi. The extraction of mycotoxins was made with the Stoloff et al. (1971), Thomas et al. (1975) and Romer (1986) techniques. The mycotoxins were identified by thin layer chromatography (TLC), infra-red espectrumetry and mass espectrumetry. The biological - test was done also using horses and donkeys treated with the found mycotoxins.

In the analysis and identification of the mycoflora - the fungi Fusarium moniliforme, F. subglutinans and F. anthophilum were found.

Two types of mycotoxins were found and they corresponded to type B trichothecenes in TLC, this technic and the infra-red espectrumetry showed the presence of Fusarenone X. The fulfilled studies showed that moniliformin is not the cause of these diseases.

The found mycotoxin, responsible of brain edema, was identified as Fusarenone X, when this mycotoxin was dosified to horses and donkeys the reproduction of brain edema was clear.

The LEM could not be reproduced.

## INTRODUCCIÓN

Restos fósiles prueban que la familia equina habitó el continente Americano durante el periodo Terciario, sin embargo, cuando Colón descubrió América en 1492, no había caballos en este continente. No se tiene una explicación contundente del por qué su desaparición fue completa y súbita, sin embargo, se piensa que antes de su extinción en el Nuevo Mundo algunos emigraron hacia Asia y Europa por el estrecho de Bering (Ensminger, 1973).

Estos emigrantes formaron la estirpe salvaje europea de la cual desciende la familia equina de hoy, y el mismo linaje también pobló a Africa con sus asnos y cebras (Ensminger, 1973).

La familia equina está integrada por el caballo, el asno, la mula y la cebra; de estos, las especies que han sido domesticadas por el hombre son el Equus caballus, el caballo, el Equus asinus, el asno o burro, y la mula, especie híbrida resultante de la cruce de yegua con burro.

La posición taxonómica del género Equus según Young, 1985, es:

Reino: Animal

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Clase: Mammalia

Familia: Equidae

Género: Equus

De los equinos dominados, el más importante y relevante ha sido sin duda el caballo.

El hombre del paleolítico desde hace 25 000 años utilizó

primero al caballo como fuente de alimentos y lo domesticó hace 5 000 años, después de los bovinos, los ovinos y los caprinos (Ensminger, 1973).

Los caballos fueron domesticados primero en el Asia Central antes del año 3000 A.C., posteriormente fueron utilizados por los egipcios y los griegos. Desde Grecia el caballo fue llevado a Roma y de allí a toda Europa, así, antes de la era cristiana el caballo ya se había difundido por todo el continente Euroasiáticoafricano (Ensminger, 1973).

El asno fue domesticado en un principio por los egipcios y propagado desde Egipto hacia el suroeste de Asia antes del año 1 000 A.C. Se introdujo a Europa a principios de la era cristiana.

El caballo fue introducido a América hace más de 400 años por los conquistadores españoles, en un principio para la conquista de México, después fueron difundidos por todo el continente por las expediciones españolas y los misioneros católicos.

La utilización del caballo por el hombre en un principio fue para la alimentación, después de la domesticación lo utilizó para carga y montura, posteriormente lo adaptó para tirar de vehículos pasando a ser un elemento indispensable para el transporte e imprescindible para las guerras, su uso se extendió a las labores agrícolas. Otro uso muy importante que se le ha dado hasta nuestros días es en los deportes, como antecedente, los griegos introdujeron al caballo en los juegos de carreras de carros y de caballos montados (Ensminger, 1973).

Los caballos alcanzaron su mayor auge en el siglo XIX y desde principios del siglo XX han sufrido un continuo -

descenso, consecuencia de la progresiva mecanización (Emsminger, 1973). En los años 1934-38 se contaba con 96 millones de caballos en el mundo, y en la actualidad se calculan sólo 50 millones, no obstante su gran importancia en los deportes y en la mejora de razas puras.

Su utilización en transporte, carga y labores agrícolas ha continuado en medios rurales de países no industrializados que no cuentan con medios económicos para mecanizar sus actividades agrícolas.

#### Antecedentes históricos:

La leucoencefalomalacia equina (LEME) es una enfermedad que tiene los primeros reportes en Estados Unidos desde 1850. También se ha reportado en China, Grecia, Sudáfrica y Alemania.

Buckley y MacCallum, en 1901, reportaron una enfermedad en caballos en Maryland, E.U., similar a la leucoencefalomalacia equina a la cual llamaron "Enfermedad del maíz mohoso".

Butler, en 1902, reportó la muerte de un equino causada por el consumo de maíz mohoso, y al estudiar el cerebro en contró licuefacción cerebral.

Graham, en 1935, reportó una epidemia de encefalomiелitis en el estado de Illinois, E.U., en donde murieron más de 5 000 caballos. También menciona un brote similar en 1893 y 1914, donde se asoció la enfermedad con el alimento a ba se de maíz. La enfermedad fue llamada de diferentes maneras: forraje venenoso, enfermedad del maíz mohoso, enferme

dad de la cañuela, encefalomiелitis equina, meningitis cerebroespinal y cerebritis. Pensó en la presencia de un virus como agente causal pero los resultados negativos de la inoculación con suspensiones de tejido cerebral de animales muertos por la enfermedad, en animales de laboratorio, evidenciaron que ésta no estaba asociada con virus.

Schwarte et al., en 1937, reportaron en Iowa, E.U. la muerte de equinos, los cuales presentaron manifestaciones de desórdenes nerviosos y al examinar los cerebros encontraron licuefacción y desintegración de la sustancia blanca en los hemisferios cerebrales, además de áreas hemorrágicas y edematosas. Atribuyeron la enfermedad al envenenamiento por maíz mohoso al reproducirla bajo condiciones experimentales y propusieron la existencia de agentes tóxicos producidos por microorganismos como responsables de esta acción.

Van der Walt y Steyn, en 1943, describieron un síndrome neurotóxico en caballos en Transvaal, Sudáfrica, caracterizado por lesiones cerebrales, daños hepáticos, edema y hemorragias. Atribuyeron la toxicosis al consumo de frijol dulce (Phaseolus vulgaris) y paja contaminada con Fusarium moniliforme.

Badiali et al., en 1968, reportaron una muerte epidémica en asnos ocurrida en Egipto, y citan brotes anteriores en 1957, 1965 y 1966. En estudios de los cerebros de asnos muertos encontraron lesiones licuefácticas en la sustancia blanca, así como hemorragias y edema. Reprodujeron la enfermedad bajo condiciones experimentales nombrándola encefalomalacia equina e involucraron a una micotoxicosis producida por el maíz mohoso como causa de ésta, descartando .

a virus, bacterias y protozoarios como agentes causales.

Wilson y Maronpot, en 1971, aislaron el hongo Fusarium moniliforme de maíz mohoso que causó leucoencefalomalacia en asnos egipcios, evidenciando a éste como productor de la toxina causante de la enfermedad. Reprodujeron los síntomas en asnos, siendo las lesiones cerebrales típicas de la leucoencefalomalacia, además mostraron que otros animales no equinos (gallinas, ratas, cerdos, hámsters, ratones y conejos) no fueron afectados al consumir alimento infectado con el hongo y reportaron que los equinos de mayor edad eran los más susceptibles.

Kellerman et al., en 1972, aislaron el hongo F. moniliforme de maíz que causó leucoencefalomalacia en caballos en Sudáfrica y manifestaron que la causa se debe a metabolitos tóxicos producidos por F. moniliforme. Trataron de reproducir los síntomas experimentalmente, obteniendo únicamente lesiones hepáticas.

Kriek et al., en 1981, trataron de reproducir los síntomas de la leucoencefalomalacia en caballos, cerdos, ovejas, ratas y mandriles a partir de alimento contaminado con F. moniliforme aislado de maíz mohoso proveniente de brotes de leucoencefalomalacia en Sudáfrica. Observaron lesiones cerebrales únicamente en los caballos y lesiones en hígado, riñón y corazón en los demás animales. También implicaron como posible causa a la toxina moniliformina producida por este hongo.

Correa et al., en 1982, reportaron un brote de leucoencefalomalacia equina en Brasil; aislaron a F. moniliforme de maíz mohoso y en los estudios histopatológicos de los cerebros de equinos encontraron las lesiones típicas de la en-

fermedad.

Sánchez et al., en 1987, realizaron estudios anatomopatológicos de equinos procedentes de Xochimilco, D.F. en México, los cuales murieron con síntomas de leucoencefalomalacia. Encontraron lesiones cerebrales además de lesiones en hígado y riñón.

### Síntomas:

La leucoencefalomalacia es una enfermedad que se presenta en caballos y asnos, originándose como resultado de una micotoxicosis debida al consumo de alimento, principalmente maíz, contaminado con el hongo Fusarium moniliforme Sheldon. Se desconoce la toxina producida por este hongo y el mecanismo por el cual ésta induce el proceso patológico. Algunos investigadores han llegado a mencionar a la micotoxina moniliformina como el posible factor patológico (Kriek et al., 1981, y Marasas et al., 1984).

Esta enfermedad se caracteriza por lesiones a nivel de sistema nervioso central, principalmente en el cerebro, notándose además edema cerebral (hinchazón producida por la retención de líquido intersticial) y lesiones en órganos viscerales, principalmente en el hígado. La relación entre las lesiones viscerales y las lesiones cerebrales es desconocida, sin embargo, en la mayoría de los casos los daños cerebrales van acompañados por daños viscerales (Van Der Walt y Steyn, 1943; Wilson y Maronpot, 1971; Kellerman et al., 1972 y Correa et al., 1982).

### Síntomas clínicos:

Los animales enfermos presentan pérdida de apetito, temperatura corporal alta, lagrimeo, respiración rápida, movimientos periódicos violentos de patas y cabeza, incoordinación al caminar, deambular en círculos, miembros posteriores cruzados, movimientos lentos de ojos, depresión, cabeza en posición hacia abajo, orejas erectas, apoyo de la cabeza contra la cerca u objetos sólidos, problemas visuales que llegan a ceguera, postración y muerte entre las diez y cuarenta y ocho horas después de los primeros signos clínicos.

### Lesiones macroscópicas:

Las lesiones que presenta la leucoencefalomalacia equina se caracterizan por un reblandecimiento debido a necrosis de tipo licuefactivo (malacia) limitado a la sustancia blanca de uno o ambos hemisferios cerebrales, dando como resultado desintegración del tejido cerebral con la consecuente formación de cavidades en el cerebro (ver Figura 1 y 2). Este proceso degenerativo va acompañado de congestión, hemorragias y edema cerebral que generalmente se encuentran rodeando la zona afectada. En ocasiones las zonas edematosas se encuentran distribuidas en forma irregular. Las lesiones en proceso degenerativo presentan un color rojo-grisáceo (Sánchez et al., 1987).

Estos daños en algunas ocasiones se presentan en cerebelo, tallo cerebral y médula espinal (Schwarte, et al., 1937; Bister, et al., 1940; Wilson, et al., 1973 y Correa, et al., 1982).

En órganos viscerales los daños son: hígado hinchado y congestionado, riñón y bazo congestionados.

Figura



Figura 2

- Figura 1: Cavidades formadas por la necrosis licuefactiva (malacia) en la substancia blanca del cerebro.\*  
LEM= Leucoencefalomalacia
- Figura 2: Necrosis licuefactiva (malacia) y hemorragias en substancia blanca del cerebro.\*  
LEM= Leucoencefalomalacia

### Lesiones microscópicas:

Desintegración del tejido nervioso en el área subcortical de la sustancia blanca (ver Figura 3); congestión de vasos (ver Figura 4); infiltración perivascular de leucocitos - (neutrófilos, linfocitos y eosinófilos), macrófagos y plasmocitos; infiltración de astrocitos, oligodendrocitos y células ependimarias (gliosis) y zonas edematosas (ver Figura 5) distribuidas perivascular e irregularmente (Schwartz, et al., 1937; Wilson y Maronpot, 1971; Kellerman, et al., 1972 y Kriek, et al., 1981).

En órganos viscerales el hígado presenta degeneración endoteliovascular; proliferación de tejido fibroso (fibroplasia) alrededor de venas centrales dando como resultado el engrosamiento de éstas y degeneración grasa de hepatocitos (hepatosis). En riñón se presenta congestión y engrosamiento de los vasos sanguíneos, degeneración parenquimatosa e inflamación de las células epiteliales de los túbulos proximales (nefrosis). El bazo presenta congestión.

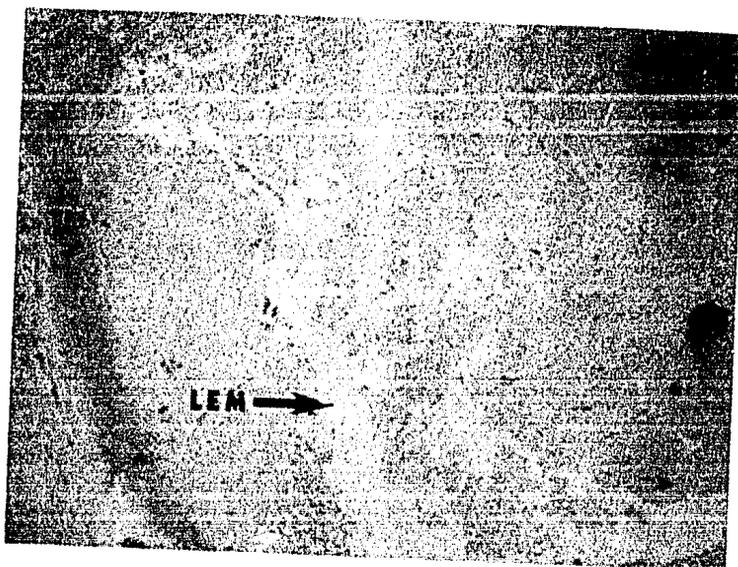


Figura 3: Desintegración de la substancia blanca del cerebro.  
63x \* LEM= Leucoencefalomalacia

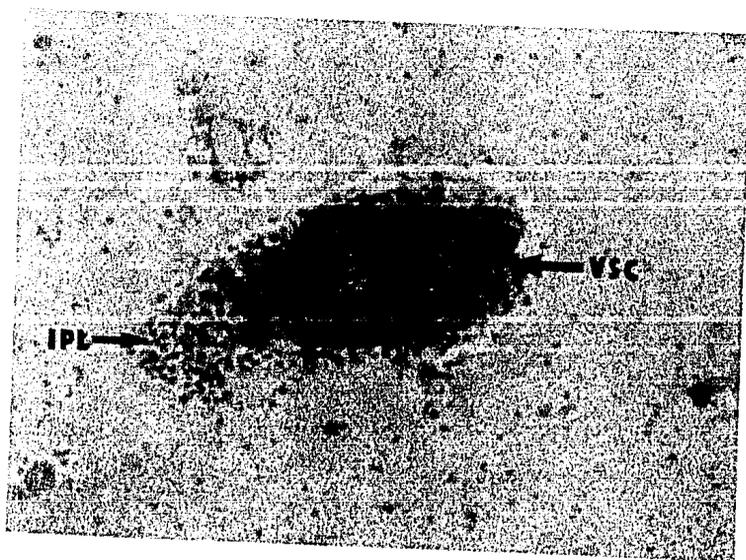


Figura 4: Vaso sanguíneo congestionado con infiltración  
perivascular de leucocitos en leucoencefaloma  
malacia. 400x \*  
IPL= Infiltración perivascular de leucocitos  
VSC= Vaso sanguíneo congestionado

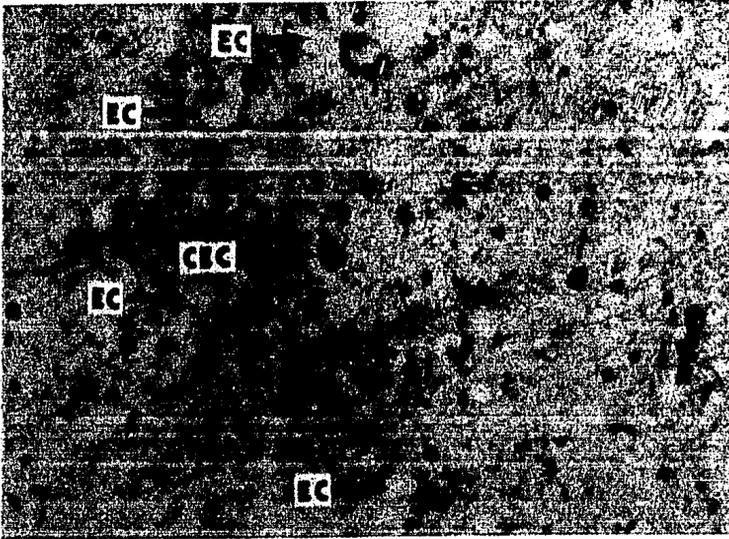


Figura 5: Infiltración de líquido intersticial (Edema) y presencia de células de Edema citotóxico. 400x \*  
EC= Edema cerebral  
CEC= Células de Edema citotóxico.

\* Fotografías proporcionadas por la Dra. Reyna Sánchez San Martín del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

### Etiología:

Desde tiempos muy remotos a la actualidad los cereales han sido el alimento básico de la humanidad; desde el conocimiento de estos el hombre ha tratado de mejorar sus granos para obtener un mayor rendimiento. Hoy en día se han logrado producir granos mejorados, sin embargo, no dejan de ser susceptibles al ataque de diversos factores - que merman la producción y calidad de estos. Uno de estos factores son los hongos que atacan a los cereales ya sea en el campo o durante su almacenamiento. Algunos de estos hongos producen metabolitos secundarios tóxicos llamados micotoxinas. Estas son importantes porque están implicadas en toxicosis de animales incluyendo el hombre, producidas por el consumo de alimento contaminado con hongos.

Dentro del gran número de hongos que parasitan a los cereales se encuentra el género Fusarium, que es un grupo cosmopolita saprobio y fitopatógeno; este género tiene gran importancia en la agricultura ya que fácilmente parasita a un gran número de plantas cultivables.

La clasificación taxonómica de este hongo según Ulloa y Hanlin, 1978, es:

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Tuberculariaceae

Género: Fusarium

Fusarium moniliforme Sheldon. es el patógeno más común de la mazorca del maíz en todo el mundo, tanto en ambientes cálidos y húmedos, como ambientes secos, y se ha logrado aislar del 100% de semillas en algunas muestras - (Manns, 1923; Nelson y Osborne, 1956; Tuite, 1961; Kellerman, et al., 1972; Medina y Zenteno, 1976; Marasas, et al., 1981; De León, 1984 y Tsung-Che y Li-Lin, 1986).

En las mazorcas Fusarium moniliforme se circunscribe - principalmente a granos individuales o a áreas limitadas de la mazorca. Los granos infectados desarrollan un moho algodonoso (De León, 1984).

El género Fusarium presenta un importante número de especies productoras de micotoxinas (ver Tabla 1) relacionadas con enfermedades tóxicas en humanos como el cáncer esofágico y en animales como síndromes hemorrágicos y estrogénicos, edema pulmonar, cirrosis, hepatosis, trombosis cardiaca, carcinoma esofágico y leucoencefalomalacia entre otras (Mirocha y Christensen, 1983 y Marasas, et al., 1984).

Se conocen cuatro principales grupos de micotoxinas - producidas por Fusarium (ver Figura 6), Butenolida, Moniliformina, Tricotecenos y Zearalenona (Eppley, 1979; Kaminura, et al., 1981; Thiel, et al., 1982; Marasas, et al., 1984 y Visconti, et al., 1984). Los tricotecenos y sus derivados (ver Tabla 2) son los que más producen los hongos de este género.

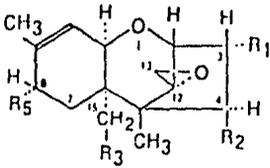
Los tricotecenos han sido clasificados con base en su estructura (sistema sesquiterpenoide tetracíclico) en - cuatro grupos (Visconti, et al., 1984), de los cuales los

Tabla 1 : Especies toxígenas de Fusarium\*

Sección	Especies
Eupionnotes	<u>F. merismoides</u>
Arachnites	<u>F. nivale</u> <u>F. larvarum</u>
Sporotrichiella	<u>F. sporotrichioides</u> <u>F. chlamydosporum</u> <u>F. poae</u> <u>F. tricinctum</u>
Roseum	<u>F. avenaceum</u>
Arthrosporiella	<u>F. semitectum</u>
Gibbosum	<u>F. equiseti</u> <u>F. acuminatum</u>
Discolor	<u>F. sambucinum</u> <u>F. culmorum</u> <u>F. graminearum</u>
Liseola	<u>F. moniliforme</u> <u>F. proliferatum</u> <u>F. subglutinans</u> <u>F. anthophilum</u>
Elegans	<u>F. oxysporum</u> <u>F. solani</u>

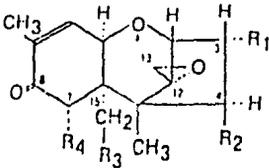
\* International Toxic Fusarium Reference Collection  
Fusarium Research Center  
The Pennsylvania State University, USA.

TRICOTECENOS



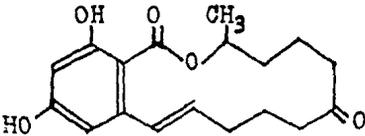
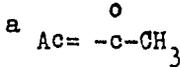
TIPO A

R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	
OH	OAc <sup>a</sup>	OAc	O <sup>3</sup> OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	...Toxina T-2
OH	OH	OAc	O <sup>3</sup> OC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	...Toxina HT-2
OH	OAc	OAc	H	.....Diacetoxiscirpenol
OH	OAc	OAc	OH	.....Neosolanol

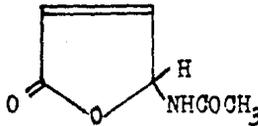


TIPO B

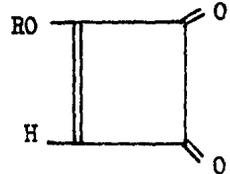
R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	
OH	OH	OH	OH	.....Nivalenol
OH	H	OH	OH	.....Deoxinivalenol
OH	OAc	OH	OH	.....Fusarenona X



ZEARALENONA



BUTENOLIDA



MONILIFORMINA

R = Na o K

Figura 6 : Micotoxinas producidas por el género Fusarium.  
(Eppley, 1979; Kamimura, et al., 1981; Thiel, et al., 1982; Marasas, et al., 1984 y Visconti, et al., 1984).

Tabla 2: Relación de las Fusariotoxinas conocidas (Marasas, *et al.*, 1984).

Nombre de la Fusariotoxina	Sinónimos	Nombre químico
Acetato de neosolaniol	8-Acetilneosolaniol Monoacetato de neosolaniol	4, 8, 15-triacetoxi-3 -hidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-eno
Acetil Toxina T-2	—————	3, 4, 15-triacetoxi-8 -(3-metilbutiriloxi)-12,13-epoxitricoteco-9-eno
Acido Fusárico	Acido Fusarínico	Acido 5-butílpicolínico
Butenolida	—————	4-acetamido-4-hidroxi-2-Acido butenoico -lactona
Calonectrina	—————	3, 15-diacetoxi-12,13-epoxitricoteco-9-eno
15-Deoacetylcalonectrina	15-De-0-acetylcalonegtrina	3 -acetoxi-15-hidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-eno
Deoxinivalenol	Toxina Rd Vomitoxina	3, 7, 15-trihidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-en-8-ona
Diacetildeoxinivalenol	Diacetato de deoxinivalenol	3, 15-diacetoxi-7 -hidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-en-8-ona
Diacetilnivalenol	Diacetato de nivalenol	4, 15-diacetoxi-3, 7 -dihidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-en-8-ona
Diacetoxiscirpendiol	7 -Hidroxidiacetoxiscirpenol	4, 15-diacetoxi-3, 7 -dihidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-eno
Diacetoxiscirpenol	Anguidina	4, 15-diacetoxi-3 -hidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-eno
Diacetoxiscirpentriol	7 ; 8 -Dihroxidiacetoxiscirpenol	4, 15-diacetoxi-3, 7, 8 -trihidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-eno
Escirpentriol	—————	3, 4, 15-trihidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-eno
Fusarenona-X	Fusarenona Monoacetilnivalenol Monoacetato de nivalenol	4 -acetoxi-3, 7, 15-trihidroxi-12,13-epoxitricoteco-9-en-8-ona

Tabla 2: Continuación.

Nombre de la Fusariotoxina	Sinónimos	Nombre químico
1,4-Ipomeadiol	————	1-(3-furil)-1,4-pentanediol
Ipomeanina	————	1-(3-furil)-1,4-pendanelona
1-Ipomeanol	————	1-(3-furil)-1-hidroxi-4-pentanona
4-Ipomeanol	————	1-(3-furil)-4-hidroxi-4-pentanona
Moniliformina	————	Sal de sodio o potasio de 1-hidroxiciclobut-1-eno-3,4-diona
Monoacetato de deoxinivalenol	3-Acetildeoxinivalenol	3 -acetoxi-7 ,15-dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-en-8-ona
Monoacetoxiscirpenol	————	15-acetoxi-3 ,4 -dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno
Monodeacetylanguidina	4-Acetoxiscirpenediol 15-acetilscirpentriol	4 -acetoxi-3 ,15-dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno
Neosolaniol	8 -Hidroxidiacetoxiscirpenol Solaniol	4 ,15-diacetoxi-3 ,8 -dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno
Nivalenol	————	3 ,4 ,7 ,15-tetrahidroxi-12,13-epoxitricotec-9-en-8-ona
Toxina HT-2	————	15-acetoxi-3 ,4 -dihidroxi-8 -(3-metilbutiriloxi)-12,13-epoxitricotec-9-eno
Toxina NT-1	Toxina T-1	4 ,8 -diacetoxi-3 ,15-dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno
Toxina NT-2	————	4 -acetoxi-3 ,8 ,15-trihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno
Toxina T-2	————	4 ,15-diacetoxi-3 -hidroxi-8 -(3-metilbutiriloxi)-12,13-epoxitricotec-9-eno
Triacetoxiscirpendiol	————	4 ,8 ,15-triacetoxi-3 ,7 -dihidroxi-12,13-epoxitricotec-9-eno

Tabla 2: Continuación.

Nombre de la Fusariotoxina	Sinónimos	Nombre químico
Triacetoxiscirpenol	_____	3,4,15-triacetoxi-12,13-epoxitricotec-9-eno
Zearalenol	_____	2,4-dihidroxi-6-(6,10-dihidroxi-trans-1-undecenil)-ácido benzoico -lactona
Zearalenona	P-2	6-(10-hidroxi-6-oxo-trans-1-undecenil)-lactona del ácido resorcilico

grupos A y B son producidos por Fusarium (ver Figura 6).

Se establece a Fusarium moniliforme Sheldon. como fito patógeno y agente fúngico responsable de la leucoencefalomalacia equina y edema cerebral equino (Graham, 1935; Schwarte, et al., 1937; Badiali, et al., 1968; Wilson y Maronpot, 1971; Kellerman, et al., 1972; Wilson, et al., 1973; Marasas, et al., 1976; Kriek, et al., 1981; Correa, et al., 1982; Marshall, 1984 y Domenech, et al., 1985).

Distribución geográfica de encefalopatías de equinos en México.

En México el Sistema de Vigilancia Epizootiológica de la Dirección General de Sanidad Animal de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (S.A.R.H.) es el organismo gubernamental encargado de vigilar y controlar los brotes epizootiológicos que se presentan en los animales domésticos (ganado equino, porcino, bovino, etc.) en todo el país.

Este organismo ha registrado un gran número de reportes de brotes de encefalopatías de equinos en todos los Estados de la República (ver Tabla 3), siendo en los Estados del centro del país donde existe el mayor número de reportes de enfermedades cefálicas de equinos (ver - Figura 7).

Los registros correspondientes de 1979 a 1987 muestran un aumento en los Estados donde se reportan brotes de encefalopatías de equinos (ver Tabla 4).

Estos brotes han tenido un aumento significativo año con año, siendo en el año de 1987 donde se presentó el mayor número de reportes de estos brotes (ver Figura 8).

En 1986, de una población total de 3 043 equinos de los lugares donde se reportaron brotes de encefalopatías murieron 79 de ellos. En 1987 la población total fue de 29 673 equinos de los cuales murieron 266 (Sistema de Vigilancia Epizootiológica de la Dirección General de Sanidad Animal, S.A.R.H.).

Estas cifras indican un aumento en el número de muertes de equinos por encefalopatías que con seguridad au-



Tabla 3: Continuación.

ESTADO	MUNICIPIO	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987
Hidalgo	Chapatongo				1					
	Mixquiahuala									2
	Pachuca	1							1	
	Progreso									1
	Tizayuca						1			
	Tlanchinol									1
	Tlaxcoapan								1	
Jalisco	Zempoala								1	
	Ameca								1	
	Autlán									1
	C. Castillo								2	
	Tecalitlán									1
	Tecolotlán									5
	Tepetitlán						1			
Edo. de México	Tlaquepaque									2
	Zapotitlán									1
	Ecatepec									1
	Hueyoxtla				1					
	Naucalpan			1						
	Ozumba						1			
	Polotitlán					1				
	Teoloyucan	1								
	Texcoco									1
	Tezotzotlán								1	
Michoacán	Tianquistengo									1
	Toluca				1					
	Zumpango				1				1	
	Apatzingán					1				
	Churintzio									1
	Churumuco	1								
	La Piedad						1			1
Penjamillo						1				
Morelos	Villa Morelos						1			
	Yurécuaro				1					
	Zamora									1
	Tlaquilténango									1
Nuevo León	General Terán	2								
	Juárez						1			
	Villa Aldama	1								
Oaxaca	Chahuites								1	
	Huajuapán								2	
	Ixhuatán								1	
	Juchitán						1			
	Ocoatepec						1			
	Pinotepa Nacional				1	1				
	Pochutla					1				
	San Jerónimo									1
	Sn. Juan Cotzocon			1						
	San Pedro									1
	San P. Tututepec					1				
	Santiago Tetepec					1				
Sto. Domingo						1				

Tabla 3: Continuación.

ESTADO	MUNICIPIO	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987
Puebla	Acateno					1				
	Atlixco									1
	Petlanzingo								2	
	Puebla									1
	Tehuacán									1
	Tlachichuca									1
Querétaro	Tlacuitlapa		1							
	Las Villas				2					
Quintana Roo	Querétaro						1		1	
	Can-Cón				1					
	Carrillo Puerto				1					
	Lázaro Cárdenas		1							
San Luis Potosí	Othón P. Blanco						2			
	Jd. del Maíz								1	
	Jd. Valles									1
	Guadalcazar						2			
	Salinas				1					
	San Francisco				1					
	San Luis Potosí						1			
	Tamuín				1					
	Tauquian		1							
	Villa Arriaga						3			
Sinaloa	Villa de Arista						1			
	Concordia			1						
Sonora	Alamos				2					
	Baucope									1
	Hermosillo									1
	Rosario					1				
	Santa Cruz		1							
Tabasco	Comcalco							1		
	Emiliano Zapata									1
	Tenosique									1
Tamaulipas	Jd. Victoria								1	
	Reynosa	1								
	Soto la Marina				1					
	V. González			1						
Tlaxcala	Ixtauixtla									1
	Interco			1						
	Sn. M. de la Presa				1					
	Panotla							1		
	Tlaxcala									1
Veracruz	Emiliano Zapata						1			
	Espinal						1			
	Hidalgotitlán			1						
	La Antigua						2			
	Lerdo Tejada			1						
	Ozuluama					1				
	Playa Vicente						1			
	Santiago Tuxtla						1			1
	Tamiahua								1	
	Tuxpan					1			1	1
	Veracruz						1		1	

Tabla 3: Continuación.

ESTADO	MUNICIPIO	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1987
Yucatán	Acanceh								1	
	Boctzotz							1		1
	Mérida								1	
	Panabá							1		
	Sucilá							1		
	Tizimin		1					1		
Zacatecas	C. del Oro									1
	Pco. R. Munquía									1
	Huanusco									1
	Juan Aldama						1			
	Pinos				1					
	Valparaíso						3			
	Villa de Cos						1			
	Zacatecas								1	1

\* - Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1986.

- Sistema de Vigilancia Epizootiológica de la Dirección General de Sanidad Animal, S.A.R.H. (comunicación personal).

- Vieyra, C., 1985.

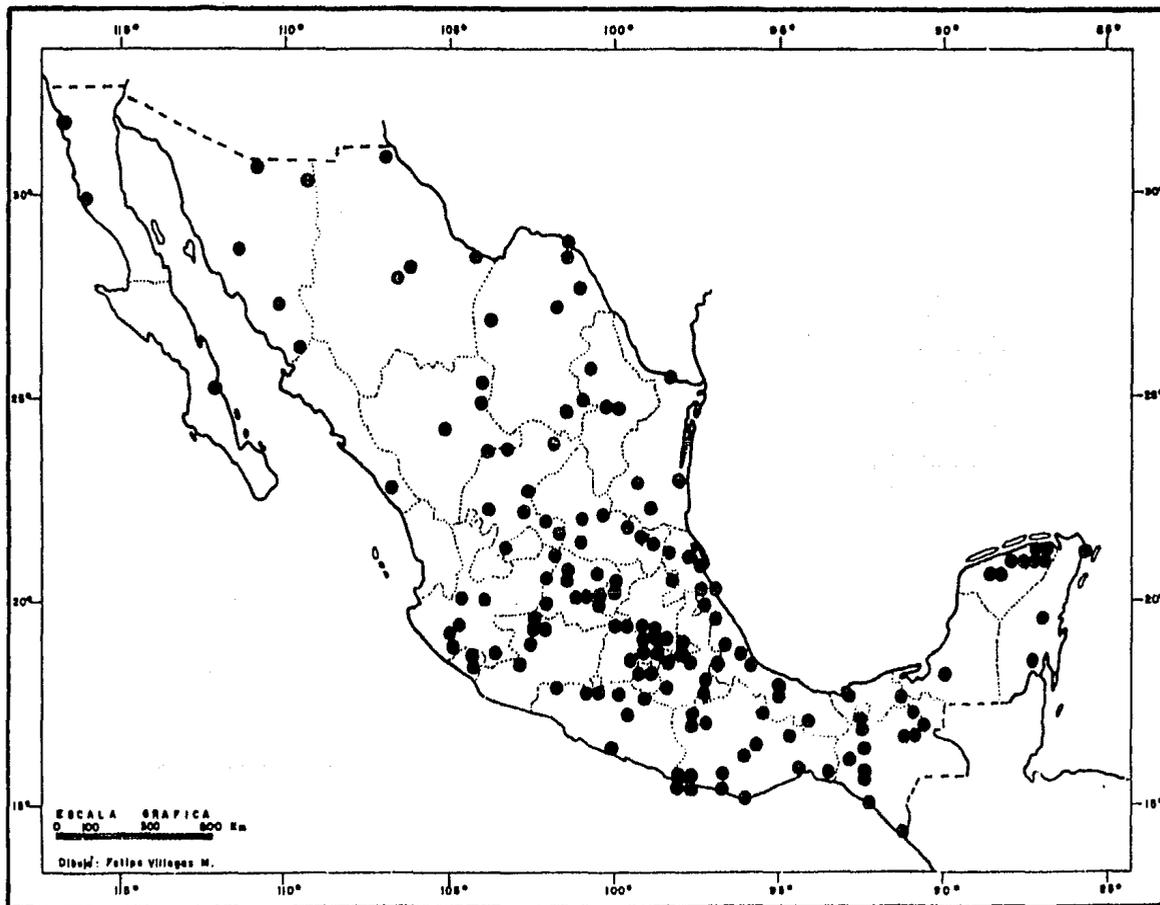


Figura 7. Distribución geográfica de brotes de encefalopatías reportadas en México durante el período de 1979-87.

Tabla 4 : Número de brotes de encefalopatías de equinos reportadas en México durante el periodo de 1979 a 1987.

Año	Estados Reportados	Brotos Reportados
1979	8	11
1980	10	10
1981	9	10
1982	16	30
1983	9	15
1984	19	53
1985	1	4
1986	18	37
1987	19	59

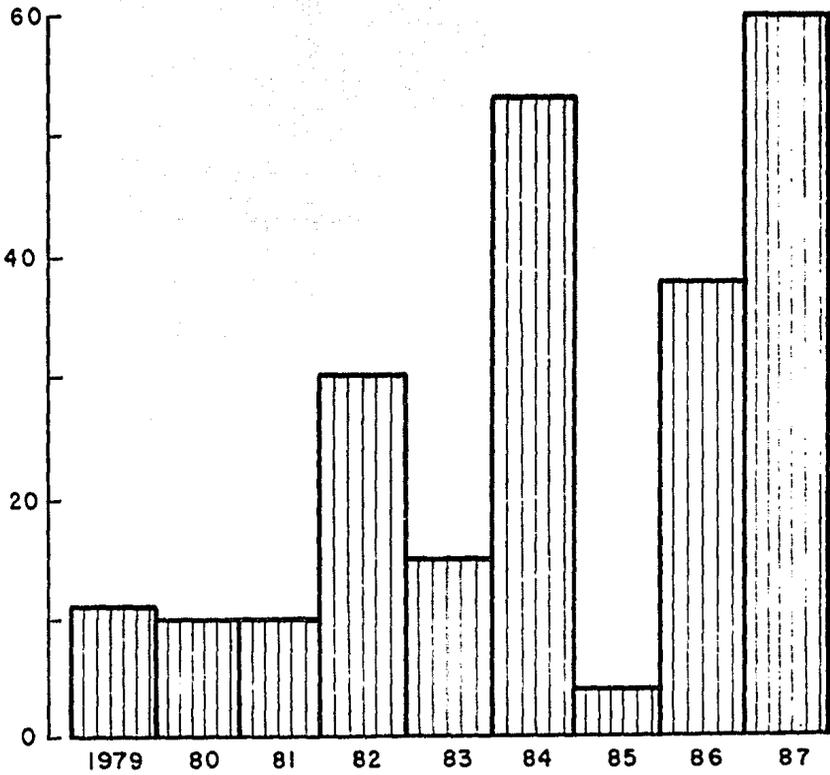


Figura 8. Número de brotes de encefalopatías reportadas en México durante el período de 1979-87.

mentarán año con año.

En México no existen reportes de encefalopatías de equinos debidas a toxicosis, en general siempre se atribuye a virus como factor patológico.

Estos brotes de encefalopatías de equinos se reportan - principalmente en el medio rural mexicano, donde nuestros campesinos por su situación económica hacen indispensable el uso de caballos, asnos y mulas para sus labores cotidianas.

Por consiguiente, no existiendo en el país un estudio - completo sobre leucoencefalomalacia y edema cerebral, este primer trabajo pretende establecer un antecedente que muestre que las encefalopatías de equinos también pueden ser causadas por el consumo de alimento contaminado por hongos y sus micotoxinas, y de esa manera facilitar una buena medida de control.

### OBJETIVOS

Por lo tanto los objetivos de la presente tesis son:

- 1.-Aislar y determinar las especies del hongo Fusarium de los alimentos contaminados procedentes de lugares donde se reportaron brotes de leucoencefalomalacia y edema cerebral equino.
- 2.-Aislar e identificar las micotoxinas de las muestras de alimento.
- 3.-Reproducir la leucoencefalomalacia y edema cerebral mediante la prueba biológica utilizando las micotoxinas encontradas en el alimento analizado.

## MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se realizó en los laboratorios de Fitopatología del Instituto de Biología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se analizó alimento contaminado proveniente de Tantoyuca, Tianguistengo y Atizapán de Zaragoza en el Estado de México y de Tecolotlán, Jalisco, lugares donde se reportaron brotes de leucoencefalomalacia y edema cerebral en equinos. Las muestras estudiadas consistieron de cebada en semilla y maíz trillado, molido, desgranado y en mazorca (ver Tabla 5).

A estas muestras se les hizo análisis de micoflora; determinación a nivel de especie del género Fusarium spp.; extracción de micotoxinas utilizando tres diferentes técnicas; identificación de micotoxinas por cromatografía de capa fina, espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas.

Además, se realizó microscopía electrónica de barrido a los hongos encontrados en las muestras de alimento contaminado, microscopía electrónica de transmisión a cerebros de caballos con leucoencefalomalacia y edema cerebral y la prueba biológica en caballos y asnos.

### 1.-Medios de cultivo.

Los medios de cultivo utilizados para el aislamiento y purificación de los hongos fueron; Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Papa-Sucrosa-Agar (PSA) y Cloruro de Potasio-Agar (KCl-Agar).

Tabla 5: Muestras de cereal contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de encefalopatías en equinos.

Fecha	Cereal	Número de muestra	Lugar	Enfermedad reportada	Tipo de equino
13-III-1987	Cebada	1	Tantoyuca, Edo. de México	L.E.M.E	Caballos y asnos
13-III-1987	Cebada	2	Tantoyuca, Edo. de México	L.E.M.E.	Caballos y asnos
13-III-1987	Maíz <u>tri</u> <u>llado</u>	3	Tantoyuca, Edo. de México	L.E.M.E.	Caballos y asnos
20-III-1987	Maíz en mazorca	4	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	Asnos
20-III-1987	Maíz en mazorca	5	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	Asnos
20-III-1987	Maíz en mazorca	6	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	Asnos
20-III-1987	Maíz en mazorca	7	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	Asnos
15-XI-1987	Cebada	8	Atizapán de Zaragoza, Edo de México	Hemorragia cerebral	Caballo
24-III-1988	Maíz en mazorca	9	Tecolotlán, Jalisco	L.E.M.E.	Caballos
24-III-1988	Maíz en mazorca	10	Tecolotlán Jalisco	L.E.M.E.	Caballos
24-III-1988	Maíz <u>des</u> <u>granado</u>	11	Tecolotlán Jalisco	L.E.M.E.	Caballos
24-III-1988	Maíz molido	12	Tecolotlán Jalisco	L.E.M.E.	Caballos

L.E.M.E = Leucoencefalomalacia equina

E.C.E = Edema cerebral equino

La metodología para la elaboración de los medios de cultivo utilizados se presenta a continuación:

a) Medio de Papa-Dextrosa-Agar (PDA).

Se calentaron 200 g de papa blanca pelada y cortada en trozos en un matraz Erlenmeyer con 1 litro de agua destilada por 10 minutos.

A la infusión se le agregaron 20 g de agar y 15 g de dextrosa y se agitó la mezcla.

Se colocó un tapón de algodón en la boca del matraz y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Veinte mililitros de medio de cultivo ya esterilizado se vaciaron en cada una de las cajas de Petri (previamente esterilizadas en un horno a 170° C por 1 hora) dentro de una campana de flujo laminar para evitar contaminación.

Finalmente, cuando el medio solidificó las cajas de Petri fueron colocadas en el cuarto de incubación a 25° C durante 24 horas antes de usarse, para asegurar que no hubiera una contaminación.

b) Medio de Papa-Sucrosa-Agar (PSA).

Se prepararon 500 ml de extracto de papa con 450 g de papas blancas peladas y cortadas en trozos, colocándolas en un matraz Erlenmeyer de 2 litros que contenía 1 125 ml de agua destilada y se calentaron durante 10 minutos.

La infusión se vació a otro matraz al cual se le colocó un tapón de algodón y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Una vez preparado, 500 ml de extracto de papa se mezclaron con 500 ml de agua destilada y se agregaron 20 g de sucrosa y 20 g de agar.

La mezcla se calentó hasta que el agar se disolvió.

Posteriormente, el medio se distribuyó en 2 matraces Erlenmeyer de 1 litro, se les colocó un tapón de algodón a cada uno y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Se vaciaron 20 ml de medio en cada una de las cajas de Petri y cuando solidificaron se incubaron a 25° C durante 24 horas antes de usarse.

c) Medio de Cloruro de Potasio-Agar (KCl-Agar).

Se mezclaron 15 g de agar con 8 g de Cloruro de Potasio (KCl) en 500 ml de agua destilada.

La mezcla se calentó hasta que el agar se disolvió.

Posteriormente, se aforó a un litro con agua destilada.

El medio se distribuyó en 2 matraces Erlenmeyer de 1 litro, se les colocó un tapón de algodón a cada uno y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Veinte mililitros de medio se vaciaron en las cajas de Petri y cuando solidificaron se incubaron a 25° C durante 24 horas antes de usarse.

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizó material de vidrio marca Pyrex, una balanza granataria - marca Ohaus, autoclave marca Arthur H. Thomas Co., campana de flujo laminar marca Veco, horno marca Despatch Oven

Co., la dextrosa de Productos Químicos Monterrey, S.A., el agar y sucrosa de Bioxon de México, S.A. y el Cloruro de - de Potasio (KCl) de J.T. Baker, S.A.

## 2.-Aislamiento de micoflora.

Para el aislamiento de los hongos de las muestras anali zadas (Tabla 5) y con los 3 medios descritos anteriormente se realizó la siguiente metodología:

Se lavaron 15 semillas de cada muestra en agua destilada y esterilizada por 1 minuto y se pasaron otro minuto - en una solución de hipoclorito-agua destilada y esterilizada (2:1 v/v).

Junto a un mechero con pinzas de disección se colocaron 5 semillas lavadas y desinfectadas en 3 cajas de Petri - con PDA.

Las cajas de Petri se colocaron en el cuarto de incubación a 25°C durante 7 días.

Al final de esta incubación, se observó el crecimiento de las colonias de hongos y se elaboraron preparaciones - para observarlas al microscopio y realizar la determina-- ción a nivel de género.

Para el aislamiento y purificación del género Fusarium spp. se sembraron las colonias de Fusarium spp. encontradas en el análisis general de micoflora en medio de - PDA del siguiente modo:

Junto a un mechero se tomó con una asa bacteriológica un poco de micelio de la colonia del hongo.

Posteriormente se inoculó éste en el centro de la caja de Petri.

Las cajas se incubaron a 25°C durante 7 días.

Transcurrido el tiempo de incubación se revisaron los cultivos y cuando se observó que sólo había una colonia por caja cuyo crecimiento era a partir del centro, con características iguales a la colonia inicial, se consideró como cepa pura.

Para obtener una buena esporulación del hongo y así facilitar la determinación a nivel de especie las cepas puras de Fusarium spp. fueron sembradas en los 3 diferentes medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Papa-Sucrosa-Agar (PSA) y Cloruro de Potasio-Agar (KCl-Agar), descritos anteriormente y del mismo modo que para el aislamiento y purificación del género Fusarium.

Al término de la incubación, se elaboraron preparaciones para observar al microscopio las cepas puras de los hongos y realizar la determinación a nivel de especie.

### 3.-Multiplicación del inóculo.

Se contó con un total de 12 muestras de cereal contaminado de las cuales 7 representaban una cantidad insuficiente para la extracción de micotoxinas por lo que a partir de las cepas puras de Fusarium spp. obtenidas de estas muestras, se procedió a reproducir el hongo y sus micotoxinas en cultivos de arroz.

a) Reproducción del hongo en arroz.

Se utilizó el método de Eugenio, et al. (1970) modificado por Abbas, et al. (1984), el cual da una mayor cantidad de micotoxinas como resultado del rápido crecimiento y desarrollo del hongo.

La metodología para la elaboración del medio de arroz se describe a continuación:

Se agregaron 200 g de arroz en un frasco de boca ancha de 1 litro.

Posteriormente se agregaron 180 ml de agua destilada, de jándose reposar durante 1 hora.

A la tapa del frasco se le hizo un agujero de 2 centímetros de diámetro, al cual se le colocó un tapón de algodón.

Se agitó el arroz y se tapó el frasco.

Después se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 60 minutos.

Inmediatamente después de la esterilización se agitó el frasco para despegar el arroz.

Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Se volvió a esterilizar en autoclave a 15 libras de presión durante 60 minutos.

Nuevamente se agitó el frasco después de esta segunda esterilización.

En una campana de flujo laminar y junto a un mechero, se inoculó el arroz una vez frío, cortando un cuadrito del medio de cultivo PDA con el hongo utilizando una aguja de di sección y colocándolo dentro del frasco.

El medio de arroz inoculado se incubó a 25° C durante dos semanas.

Durante los primeros días se agitaron los frascos para facilitar la penetración uniforme del hongo en el arroz.

Posteriormente los medios se incubaron a 10° C durante otras dos semanas.

Se inocularon tres frascos de arroz por muestra, dejando tres sin inocular como testigos.

El material utilizado fue arroz empacado por Comercial Mexicana S.A., frascos de vidrio de 1 litro que contenían fruta en conserva marca Ejido, autoclave marca Arthur H. Thomas Co., campana de flujo laminar marca Veco y un refrigerador marca Kelvineitor.

#### 4.-Determinación del hongo.

Se utilizó el manual de identificación para las especies del género Fusarium de Nelson, et al. (1983) para la determinación a nivel de especie del hongo.

Este manual de identificación se formó de la combinación de otros, desarrollados de 1935 al presente, junto con investigaciones de los autores y presenta una forma práctica para la determinación.

El manual utilizado consta de una clave sinóptica para las secciones y otra para las especies, láminas en color de los cultivos de algunas especies para auxiliar a las claves y una sección ilustrada con fotografías que exhibe la morfología de las estructuras reproductoras y la descripción de las especies.

Las características consideradas para la separación de - las secciones y especies son: a) las características de - los cultivos (color, forma y crecimiento), b) el tamaño y forma de los macroconidios, c) la forma de las células basales y apicales en los macroconidios, d) la presencia o ausencia de microconidios, e) la formación en cadenas o - falsas cabezas de microconidios, f) la forma de los microconidios, g) los tipos de conidióforos (monofiálides y/o polifiálides), h) la presencia o ausencia de clamidosporas e i) la disposición o arreglo de las clamidosporas.

a) Estudio de microscopía óptica.

Se elaboraron preparaciones semipermanentes con las cepas puras de Fusarium spp. aislado de las muestras de alimento para la determinación a nivel de especie.

Las preparaciones se elaboraron de la siguiente manera:

Junto a un mechero se tomó con una aguja de disección - una pequeña porción del micelio del hongo del medio de cultivo.

En el portaobjetos se colocó una gota de alcohol del 70% y la muestra de micelio.

Con dos agujas de disección se extendió el micelio y se colocó una gota de lactofenol.

Posteriormente, se colocó el cubreobjetos y se selló al rededor con barniz de uñas transparente.

Una vez elaboradas las preparaciones se procedió a la - observación bajo el microscopio para la determinación.

Para la observación en microscopio se usaron los objetivos de 10x, 40x y 100x bajo el sistema óptico de contraste

de fases. Se utilizó un microscopio estereoscópico Carl Zeiss.

b) Estudio de microscopía electrónica de barrido.

Se realizó microscopía electrónica de barrido a los hongos encontrados en las muestras de alimento contaminado - para auxiliar la determinación a nivel de especie.

La metodología realizada fue la siguiente:

- 1.-Se tomaron muestras del hongo raspando el micelio de los medios de cultivo.
- 2.-Las muestras se fijaron en glutaraldehído al 2.5% diluido en un amortiguador de fosfatos de sodio a un pH de 7, por 1 hora.
- 3.-Se deshidrataron las muestras con alcoholes graduales al 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%, dejando media hora como tiempo mínimo en cada alcohol.
- 4.-Se colocaron las muestras en acetona haciendo 2 cambios de ella.
- 5.-Posteriormente, las muestras se procesaron en una secadora de punto crítico marca Technic CPA-II para evitar que se colapsaran. El secado a punto crítico se llevó a cabo con  $\text{CO}_2$  a una presión de 1073 libras/pulgada y a una temperatura de  $32^\circ\text{C}$ .
- 6.-Se montaron las muestras en los portamuestras metálicos y se colocaron en una ionizadora de oro.
- 7.-Finalmente las muestras se observaron en un microscopio electrónico de barrido marca Jeol modelo JSM-35C.

## 5.- Extracción de micotoxinas

Para la extracción de micotoxinas se utilizaron tres diferentes métodos o sea técnicas usadas para separar un producto orgánico (en este caso las micotoxinas) de una mezcla de reacción.

De las 12 muestras obtenidas a 7 de ellas (muestra 1 a la 7) se les hizo la extracción a partir de los cultivos de arroz ya que no se contaba con una cantidad suficiente de alimento para las extracciones y a las otras 5 (muestra 8 a la 12) a partir del alimento contaminado.

En un principio se tenían 7 muestras (1-7) que fueron procesadas por las tres técnicas de extracción (Stoloff, - et al., 1971, Thomas, et al., 1975 y Romer, 1986). Se observó que las micotoxinas extraídas eran tricotecenos, por lo tanto, cuando llegaron las demás muestras (8-12), éstas sólo se procesaron con las técnicas de Thomas, et al. (1975) y Romer (1986) (específica para tricotecenos).

Se hicieron tres repeticiones por muestra.

Por utilizar solventes altamente volátiles y tóxicos, el desarrollo de las técnicas se llevó a cabo con un manejo cuidadoso de todas las sustancias. Además se tuvo el mayor cuidado posible con el manejo de los estándares y extractos de micotoxinas ya que algunas son cancerígenas y penetran fácilmente por la piel.

Para seguridad en el trabajo se usó bata blanca, guantes de hule y mascarilla contra gases.

a) Método de Stoloff, et al., 1971. (Figura 9)

Es un método general para la extracción de micotoxinas, mediante esta técnica se pueden extraer aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, esterigmatocistina y patulina.

La metodología realizada fue la siguiente:

1.-Se licuaron 25 g de la muestra de arroz con hongo con 45 ml de acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) y 5 ml de cloruro de potasio (KCl) al 4% en una licuadora, a alta velocidad durante 2 minutos.

2.-El extracto se filtró a través de un papel filtro Whatman #4 a un embudo de separación de 250 ml.

3.-Al filtrado se le adicionaron 12.5 ml de éter de petróleo, se agitó durante un minuto, abriendo la llave para que salieran los gases. Posteriormente, cuando se formaron las dos fases, se desechó la fase superior. Este procedimiento se repitió dos veces y se realizó para desengrasar el extracto.

4.-Para decolorar el extracto se preparó un gel con 50 ml de agua destilada y 5 ml de cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ) al 10% titulándolo con hidróxido de sodio (NaOH) al 4% a un pH de 4.6 en un potenciómetro.

5.-Se vació el gel en el extracto y se agitó por un minuto, abriendo la llave para dejar salir los gases; se dejó reposar hasta que se separó el gel y se transfirieron 50 ml del extracto decolorado a un vaso de precipitado de 250 ml a través de un papel filtro Whatman #4.

6.-Se agregó el extracto en otro embudo de separación añadiendo posteriormente 5 ml de ácido clorhídrico (HCl) a un

pH de 1.5 (este paso es una modificación (Campos, 1987) de la técnica original, debido a que se ha encontrado que los ácidos ayudan a la extracción de las micotoxinas) y 12.5 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ), se agitó por un minuto liberando los gases formados. Cuando se formaron las dos fases se colectó la inferior (cloroformo) en un vaso de precipitado y se desechó la fase superior. Se repitió el proceso vaciando la fase colectada en el embudo de separación, añadiendo nuevamente 12.5 ml de cloroformo y se agitó por un minuto liberando los gases formados.

8.-Se decantó el cloroformo a otro matraz y se evaporó hasta quedar aproximadamente 1 ml, transfiriéndolo posteriormente a un vial donde se dejó evaporar por completo en una estufa a una temperatura máxima de  $40^\circ\text{C}$ .

9.-Se resuspendió la muestra evaporada con 0.5 ml de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) agitando en un vórtex por un minuto.

10.-Se aplicaron los extractos y los estándares en una placa para cromatografía de capa fina. La placa se colocó dentro de la cámara de vidrio para cromatografía, la cual contenía el desarrollador para micotoxinas preparado con 20 ml de acetona ( $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ ), 40 ml de acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ) y 60 ml de tolueno ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ).

11.-Finalmente se observó la placa bajo luz ultravioleta, marcando las manchas fluorescentes que se observaron y se midió la distancia recorrida por la mancha en la placa para calcular la velocidad de flujo o valor de  $R_f$  (Factor de retardación= distancia recorrida por el soluto entre la distancia recorrida por el solvente).

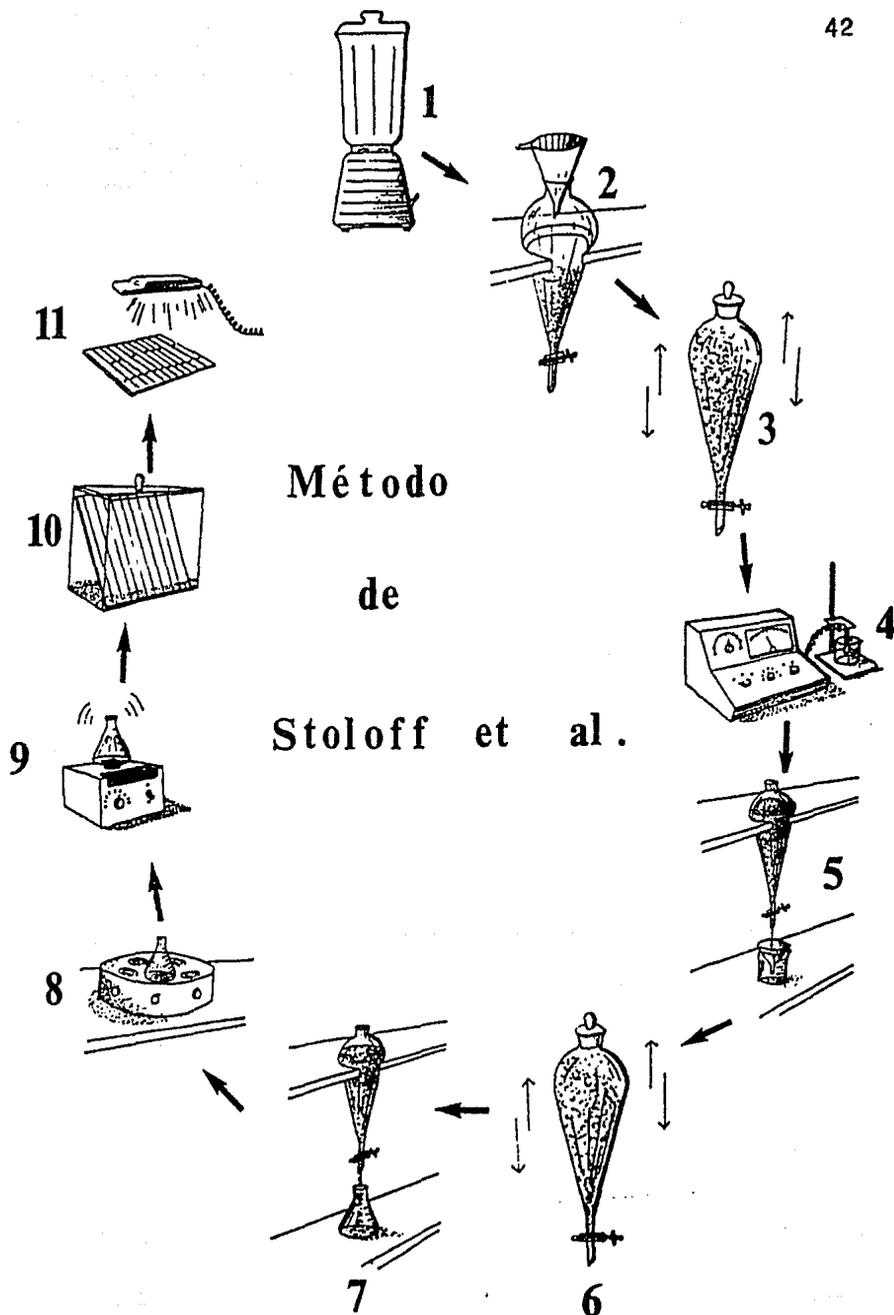


Figura 9: Método de Stoloff, et al. 1971 (tomado de Pereda, et al. 1988).

b) Método de Thomas, et al., 1975. (Figura 10)

Es un método para la extracción de aflatoxinas y zearale nona. Una ventaja que presenta esta técnica es ser un método rápido de extracción que dura 70 minutos por extracción (Campos, 1987 y Pereda, 1987).

Los pasos seguidos en este método fueron los siguientes:

- 1.-Se licuaron 50 g de muestra con 150 ml de una solución de metanol-agua (60-40 v/v), en una licuadora, a alta velocidad durante 2 minutos.
- 2.-Se filtró el extracto en papel filtro Whatman #4 a un embudo de separación de 250 ml.
- 3.-Posteriormente, se añadieron 30 ml de una solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) y 50 ml de Hexano ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$ ) en el embudo de separación y se agitó por un minuto, abriendo la llave para que salieran los gases.
- 4.-Cuando se formaron las dos fases, se transfirió la inferior (fase acuosa de metanol) a un segundo embudo de separación desechando la fase superior.
- 5.-Para la extracción del metanol acuoso, se añadieron 50 ml de cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ) agitando por un minuto y sacando los gases formados.
- 6.-Cuando se formaron las dos fases, se drenó la fase inferior de cloroformo en un matraz de 250 ml que contenía 5 g de carbonato cúprico ( $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ) para precipitar los pigmentos y se agitó durante 2 minutos.
- 7.-Se dejó asentar el carbonato cúprico y se decantó el cloroformo en un matraz de 250 ml a través de un papel fil

tro Whatman #2, el cual contenía 5 g de sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para deshidratar la muestra. Se agregaron 25 ml más de cloroformo para lavar bien el carbonato cúprico, volviéndose a decantar a través del papel filtro.

8.-Se evaporó el cloroformo con el extracto hasta quedar a proximadamente 1 ml y transfiriéndolo a un vial se dejó evaporar por completo en una estufa a una temperatura máxima de  $40^\circ\text{C}$ .

9.-Se resuspendió el extracto con 0.5 ml de metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) agitando en un vórtex durante 1 minuto.

10.-Finalmente se desarrolló la cromatografía de capa fina aplicando  $50\mu\text{l}$  del extracto y  $50\mu\text{l}$  de los estándares en los carriles de la placa y se observó con luz ultravioleta y se registraron los factores de retardación ( $R_f$ ) de las manchas fluorescentes que aparecieron en la placa.

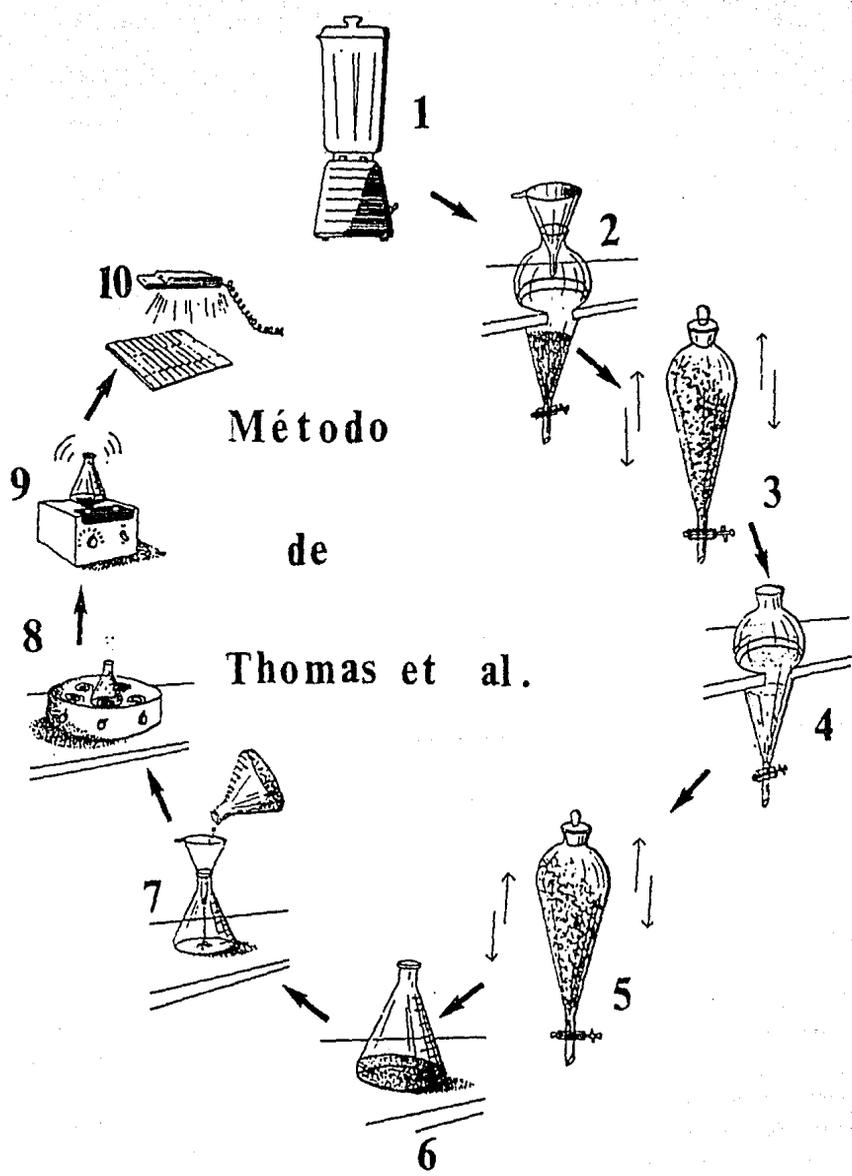


Figura 10: Método de Thomas, et al. 1975 (tomado de Pereda, et al. 1988).

c) Método de Romer, 1986. (Figura 11)

Es un método de extracción específica para micotoxinas del grupo de los tricotecenos, obtiene recuperaciones del 90-99%.

Este método puede detectar concentraciones de partes por billón de Deoxinivalenol, Fusarenona X, Nivalenol, Toxina T-2, Toxina HT-2, Neosolaniol y Diacetoxiscirpenol.

Para esta técnica se siguió el procedimiento que a continuación se describe:

1.-Se licuaron 50 g de muestra con 50 ml de acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ), 100 ml de una solución metanol-agua (1-1 v/v) y 25 ml de una solución acetonitrilo-agua (21-4 v/v), en una licuadora, a alta velocidad durante 2 minutos. El uso de acetato de etilo y de la solución metanol-agua es una modificación a esta técnica debido a que los tricotecenos del grupo A son más solubles en el primer reactivo y los del grupo B lo son en el segundo (Pathre y Mirocha, 1977).

2.-Se filtró el extracto en papel filtro Whatman #4 y se colectó en un vaso de precipitado de 250 ml.

3.-Las columnas de cromatografía se prepararon utilizando una jeringa de plástico desechable y esterilizada de 10 ml a la cual se le colocó en el fondo una capa de fibra de vidrio, arriba de ésta dos capas de papel filtro Whatman #4 y por último una mezcla de 0.75 g de carbón activado, 0.70 g de alúmina y 0.30 g de celite.

4.-Antes de pasar el extracto por la columna, se pasaron 3 ml de la solución acetonitrilo-agua (21-4 v/v) para preparar la columna.

- 5.-Se vació el extracto en la columna y se empujó lentamente con el émbolo de la jeringa, dejando un espacio de aire entre el extracto y el émbolo. El paso del extracto por la columna fue por goteo y colectado en un matraz de 125 ml.
- 6.-Se evaporó el extracto hasta 1 ml, se transfirió a un vial y se evaporó a sequedad en una estufa a una temperatura máxima de 40°C.
- 7.-Se resuspendió el extracto en 200 $\mu$ l de una solución de acetona-metanol (2-1 v/v) y se agitó en el vórtex.
- 8.-Se evaporó a sequedad y se disolvió el residuo en 200 $\mu$ l de una solución tolueno-acetonitrilo (97-3 v/v) y se agitó en el vórtex.
- 9.-Para desarrollar la cromatografía de capa fina de los tricotecenos tipo A se aplicaron 100 $\mu$ l del extracto y 200 $\mu$ l de los estándares de tricotecenos tipo A en la placa para cromatografía; posteriormente se aplicaron sobre los estándares 25 $\mu$ l de la solución tolueno-acetonitrilo y se corrieron las micotoxinas en la cámara con un desarrollador preparado con una solución de tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico al 90% (6-2-1 v/v/v).
- 10.-Se roció a la placa la solución ácida preparada con 2 ml de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y 20 ml de metanol (CH<sub>3</sub>OH).
- 11.-Se calentó la placa en un horno a 130°C durante 10 minutos y finalmente se observó bajo luz ultravioleta anotando los factores de retardación (Rf) correspondientes a las manchas fluorescentes que aparecieron en la placa.

12.-Para los tricotecenos tipo B se aplicaron en la placa 100 $\mu$ l del extracto y 200 $\mu$ l de los estándares; enseguida - se aplicaron sobre los estándares 25 $\mu$ l de la solución acetona-metanol y se corrieron las micotoxinas en la cámara con un desarrollador preparado con una solución de acetato de etilo-metanol (20-1 v/v).

13.-Se roció a la placa la solución de cloruro de aluminio preparada con 4 g de cloruro de aluminio ( $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ ) y 20 ml de metanol.

14.-Se calentó la placa en un horno a 130° C durante 10 minutos y se observó bajo luz ultravioleta registrando los factores de retardación (Rf) de las manchas que aparecieron.

El material utilizado en las extracciones fue vidriería marca Kimex y Pyrex, todas las sustancias y reactivos, la cámara para cromatografía y el papel filtro Whatman #4 marca Merck-México, S.A., excepto el carbonato cúprico y el cloruro de aluminio que fueron marca J.T. Baker, S.A., jeringas de plástico marca Plastipak, licuadora marca Osterizer, potenciómetro marca Corning modelo 12, balanza granataria marca Ohaus, estufa marca American Instruments, Co. Inc., vórtex marca Lab-line Instruments, Inc, micropipeta Eppendorf marca Fisher Scientific Co., Lámpara de luz ultravioleta marca Listed Insp. & Meas, eq. y el horno marca Felisa modelo FE 291.

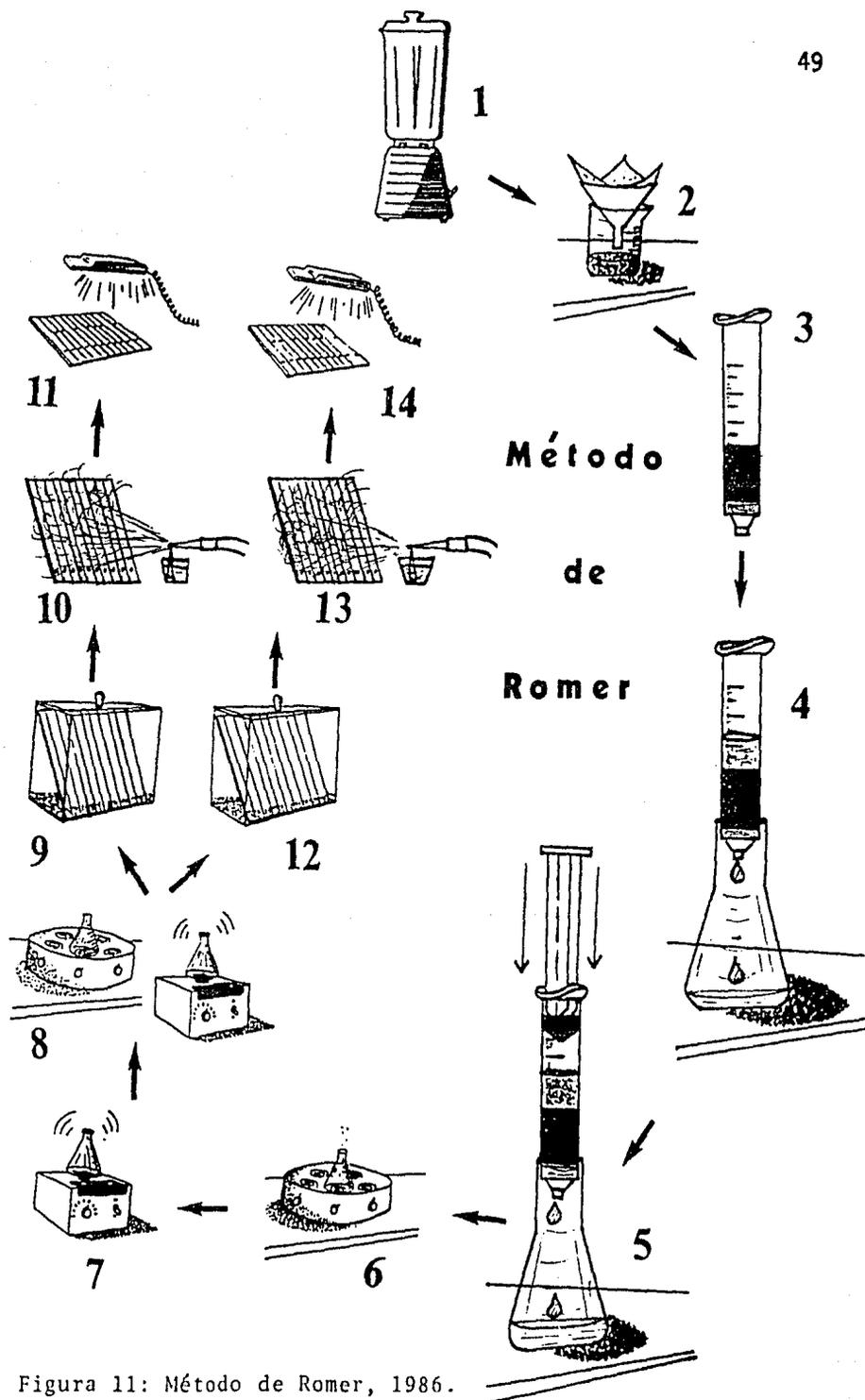


Figura 11: Método de Romer, 1986.

## 6.- Identificación de micotoxinas.

La identificación de micotoxinas se realizó inicialmente con la cromatografía de capa fina utilizando las muestras obtenidas a partir de los métodos de extracción.

Las micotoxinas que aparecieron en la placa de cromatografía que no correspondieron a ninguno de los estándares utilizados fueron posteriormente analizadas por espectroscopía infrarroja y espectrometría de masas.

### a) Cromatografía de capa fina (Figura 12).

La cromatografía es un método de análisis y separación de los diversos componentes de una sustancia, fundado en la distinta distribución de dichos componentes en dos fases, una de ellas fija (fase estacionaria) y la otra en movimiento (fase móvil). La fase móvil es la que transporta las sustancias a separar y se desplaza a través de la fase estacionaria (Campos, 1987).

En la cromatografía de capa fina la fase estacionaria está representada por gel de sílice y la fase móvil, en este caso, por el desarrollador de micotoxinas.

Esta técnica se realizó de la siguiente manera:

- 1.-Se prepararon las placas colocando 5 vidrios de 20 cm por lado y 3 mm de grosor en un soporte de placas, desengrasando la superficie de los vidrios con alcohol de 96°.
- 2.-La solución de gel de sílice se preparó mezclando 30 g de éste con 70 ml de agua destilada en un mortero durante 5 minutos.
- 3.-El gel se vació en el aplicador y éste se deslizó sobre los vidrios depositando una capa uniforme.

- 4.-Se esperó a que seicara el gel y posteriormente las placas se colocaron en el portaplasas.
- 5.-Las placas fueron metidas al horno a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora para activarlas. Activadas las placas si no son usadas en ese momento se guardan en un desecador para evitar que éstas absorban cualquier sustancia gaseosa del ambiente.
- 6.-Las placas se rayaron con líneas paralelas con una distancia de separación de 1 cm. A cada carril formado se le marcó en el centro un pequeño punto aproximadamente a 3 cm del borde de la placa para tener un mismo punto de partida en cada carril.
- 7.-Se aplicaron con una micropipeta de 50 a  $200\ \mu\text{l}$  (ver técnicas de extracción) de las muestras extraídas y de los estándares en la placa. La aplicación se realizó gota a gota esperando a que seicara la primera antes de aplicar la siguiente.
- 8.-Posteriormente la placa se metió en la cámara hermética de vidrio, sumergiéndola en el desarrollador de micotoxinas (ver técnicas de extracción). Al sumergir la placa el desarrollador no debe tocar los puntos de aplicación.
- 9.-Con un lápiz se marcó la distancia a la que llegó el desarrollador aproximadamente 3 cm antes de que éste alcanzara el tope de la placa. Se sacó la placa de la cámara y una vez seca se observó bajo una lámpara de luz ultravioleta. Con el lápiz se marcó la parte inicial y terminal de las manchas fluorescentes que aparecieron en la placa.

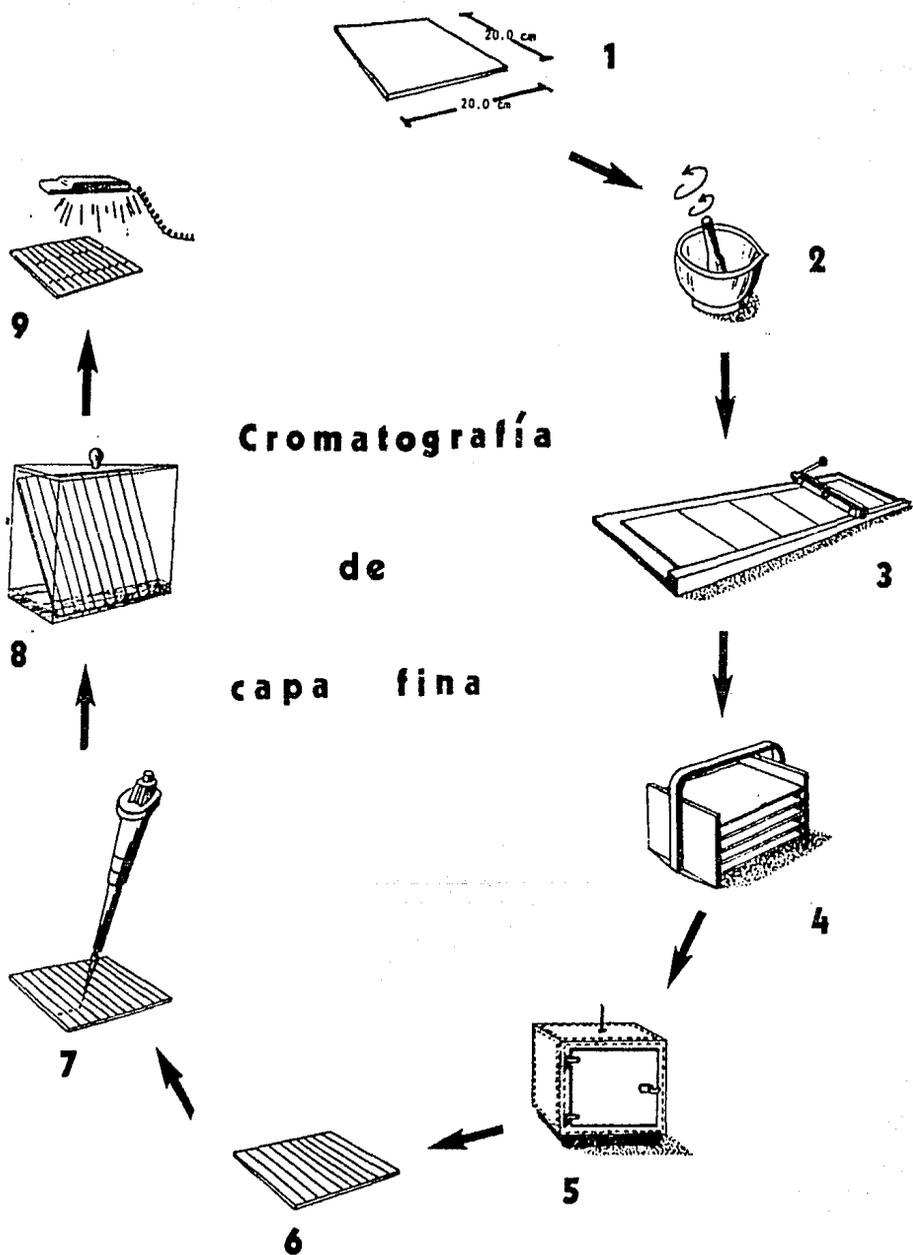


Figura 12: Cromatografía de capa fina (esquema tomado de Pereda, 1987).

Se calculó el grado de retención o factor de retardación (Rf) de las manchas fluorescentes.

El Rf es la relación del recorrido del soluto y el recorrido del disolvente.

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida por el soluto.}}{\text{distancia recorrida por el solvente.}}$$

La distancia recorrida por el soluto se midió del punto de aplicación de la muestra al límite de la mancha fluorescente y la distancia recorrida por el solvente del punto de aplicación a la distancia marcada hasta donde llegó el desarrollador.

La identificación de las micotoxinas se hizo comparando los Rf de las manchas que aparecieron de las muestras extraídas con los Rf de las manchas correspondientes a los estándares usados como referencia.

#### Preparación de los estándares:

Las micotoxinas utilizadas fueron Aflatoxinas ( $B_1, B_2, G_1, G_2$ ), Zearalenona, y los tricotecenos tipo A Diacetoxiscirpenol (DAS), Toxina T-2 y tipo B Deoxinivalenol (DON).

Las micotoxinas se encontraban en presentación sólida en ampollitas selladas con 5 mg de micotoxina en cada una. A cada ampollita se le inyectaron 5 ml de metanol ( $CH_3OH$ ) como solvente; de los 5 ml se extrajo 1 ml y se aforó a 100 ml con metanol en un matraz aforado, resultando una concentración de 10 partes por millón (10 ppm).

Así, todos los estándares utilizados tuvieron una concentración de 10 ppm.

El material utilizado en esta técnica fue cristalería marca Pyrex, cámara hermética de vidrio para cromatografía y el gel de sílice (Kieselgel 60 H) marca Merck-México, S. A., soporte de placas, porta placas y aplicador marca Desaga Heidelberg, horno marca Felisa modelo FE 291, balanza granataria marca Ohaus, microcibeta Eppendorf marca Fisher Scientific Co, lámpara de luz ultravioleta marca Listed - Insp & Meas, eq. y las micotoxinas marca Sigma Chemical Company.

b) Espectroscopía infrarroja.

Esta técnica se fundamenta en las propiedades de la luz. La luz se propaga en forma de ondas electromagnéticas llamadas longitudes de onda. Cuando cierta cantidad de luz (infrarroja) se le hace llegar a una sustancia, ésta absorbe una parte de acuerdo a su estructura molecular. Esta absorción de la luz por parte de la sustancia corresponde a cierta longitud de onda que es medida por el espectrofotómetro infrarrojo.

El espectro infrarrojo muestra un cierto número de bandas de absorción asociadas a ciertas unidades estructurales de la molécula que permiten determinar la presencia o ausencia de grupos funcionales específicos en una mezcla de reacción. El espectro de absorción de una sustancia dada es, por lo general, específico para esa, y sólo esa, sustancia (Conley, 1979).

Casi todos los compuestos, en particular las sustancias orgánicas, absorben en la región infrarroja (Conley, 1979).

Siendo las micotoxinas compuestos orgánicos, se analizaron por esta técnica las micotoxinas no identificadas en -

la cromatografía de capa fina.

La metodología realizada fue la siguiente:

#### I.-Purificación de la micotoxina.

1.-Se raspó el gel de sílice que correspondía a la micotoxina y se colocó en un vial.

2.-Se agregaron al vial 2 ml de acetato de etilo ( $C_4H_8O_2$ ) deshidratado, para lo cual el acetato de etilo se pasó a través de papel filtro Whatman #4 que contenía 5 g de sulfato de sodio anhidro ( $Na_2SO_4$ ).

3.-Se agitó el vial en el vórtex hasta que se disolvió el gel de sílice con el acetato de etilo.

4.-La suspensión se filtró a través de una jeringa de plástico esterilizada de 5 ml que contenía 2 capas de papel filtro Whatman #4.

5.-La muestra filtrada se colectó en otro vial y se evaporó a sequedad en una estufa a una temperatura máxima de  $40^{\circ}C$ .

#### II.-Análisis en el espectrofotómetro infrarrojo.

Se utilizó la técnica por depósito.

1.-Se agregaron 3 gotas de cloroformo a la muestra y se agitó en el vórtex para resuspender.

2.-Se colocó una gota de la solución en una celdilla (ventana de bromuro de potasio o monocristal) y se esperó a que secara la gota.

3.-Finalmente se colocó la celdilla en el portaceldas del espectrofotómetro y se corrió el espectro de  $4000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  a una banda de 80% de altura.

En esta técnica se utilizó el siguiente material, embudo de vidrio marca Pyrex, sustancias, reactivos y papel filtro Whatman #4 marca Merck-México, S.A., jeringas de plástico marca Plastipak, vórtex marca Lab-line Instruments, Inc, es tufa marca American Instruments, Co. Inc. y el espectrofotómetro infrarrojo marca Perkin Elmer modelo 599 B.

c) Espectrometría de masas.

Es una técnica para la separación de isótopos basada en la acción de un campo eléctrico y magnético capaz de separar los iones según sus masas respectivas.

En esta técnica las moléculas de una sustancia son ionizadas por una fuente de luz ultravioleta, esta energía provoca que se rompan las moléculas perdiendo éstas sus iones, - estos iones son detectados por el espectrómetro de masas que mide en un espectro la masa atómica de cada uno de los iones perdidos por las moléculas.

Este método se utiliza para la identificación de sustancias desconocidas ya que detecta la estructura molecular - que las compone.

Las micotoxinas no identificadas en la cromatografía de - capa fina fueron analizadas mediante esta técnica.

Para esta técnica se realizaron los siguientes pasos:

I.-Purificación de la micotoxina.

La metodología es igual a la utilizada en la espectroscopía infrarroja, a excepción del paso 5 donde la muestra filtrada se colectó en un tubo de ensayo para centrífuga de 12 ml sin evaporarse a sequedad.

## II.- Derivatización de la micotoxina (Collins y Rosen, 1979).

- 1.-Se agregaron a la muestra  $100\mu\text{l}$  de BSA (N, O-bis (tri-metilsilil) acetamida) adquirida de Sigma, S.A. y se selló el tubo colocándole un tapón de hule.
- 2.-La muestra se calentó en un horno a  $90^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas.
- 3.-Se dejó enfriar la muestra y se evaporó bajo una corriente suave de nitrógeno hasta dejar aproximadamente  $100\mu\text{l}$ , - para lo cual se colocaron dos entradas en el tapón del tubo una para la entrada del nitrógeno y otra para la salida del mismo.
- 4.-Evaporada la muestra a  $100\mu\text{l}$  se selló perfectamente el tubo para evitar la hidratación de la muestra.
- 5.-Finalmente la muestra se analizó en un espectrómetro de masas marca Hewlett Packard.

### 7.-Estudio microscópico de cerebros de equinos.

Se realizó un estudio a nivel de microscopía electrónica de transmisión de cerebros de equinos con lesiones de leucoencefalomalacia (LEM) y edema cerebral (EC), para observar los daños a nivel ultraestructural en los axones (sustancia blanca).

#### a)Estudio de microscopía electrónica de transmisión.

Para este estudio se utilizaron 3 cerebros de caballo, uno con lesiones de LEM, otro con lesiones de EC y un cerebro sano como referencia.

La metodología realizada fue la siguiente:

- 1.-Con un bisturí se cortaron trozos de cerebro en cubos de 5x5 milímetros.
- 2.-Los trozos se fijaron por 24 horas a 4° C en glutaraldehído al 6.5% con un amortiguador de Cacodilato de Sodio al 0.2 molar.
- 3.-Se fijó una hora más a 4° C en trozos más pequeños.
- 4.-Los trozos se lavaron 3 veces en amortiguador de Cacodilato de Sodio con 15 minutos en cada cambio.
- 5.-Los trozos se postfijaron con Tetraóxido de Osmio 1 hora a 4° C.
- 6.-Se lavó 3 veces en amortiguador de Cacodilato de Sodio con 15 minutos en cada cambio.
- 7.-Se realizó la deshidratación con alcohol etílico al 30%, 50%, 70%, 80% y 96%, con cambios de 15 minutos cada uno.
- 8.-Se realizaron 3 cambios en alcohol absoluto con 20 minutos cada cambio.

- 9.-Se pasaron los trozos a Óxido de Propileno con alcohol etílico en las concentraciones 3:1 v/v, 2:2 v/v, 1:3 v/v, con 20 minutos cada cambio.
- 10.-Se pasaron los trozos a Óxido de Propileno 20 minutos.
- 11.-Los trozos se pasaron a Óxido de Propileno con resina en las concentraciones 3:1 v/v, 2:2 v/v, 1:3 v/v, con 20 minutos cada cambio.
- 12.-Posteriormente los trozos se pasaron a resina durante 2 horas.
- 13.-Los trozos se incluyeron en resina nueva.
- 14.-Las muestras se pusieron a polimerizar en una estufa por 48 horas a 60° C.
- 15.-La inclusión se cortó en forma de pirámide con una navaja y se colocó en un ultramicrotomo marca Optical C. Reichert, Austria, OMU3.
- 16.-Se hicieron cortes de 250 Å con una cuchilla de vidrio de 5 milímetros de espesor.
- 17.-Los cortes se tificaron con Acetato de Uranilo (hecho al 4% en alcohol etílico del 50%) y Citrato de Plomo de Reynolds.
- 18.-Se montaron los cortes en las rejillas metálicas y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión marca Carl Zeiss.

## 8.- Prueba biológica (Figura 13).

Se utilizaron 3 caballos y 3 asnos procedentes del poblado de El Guarda en el Edo. de México.

La prueba biológica se realizó de 2 formas:

I.-Utilizando la micotoxina encontrada en la cromatografía de capa fina.

II.-Utilizando el alimento contaminado.

Las características de los animales fueron:

### Caballos

- a) Macho de 10 meses de edad con 100 Kg de peso.
- b) Macho de 10 meses de edad con 110 Kg de peso.
- c) Hembra de 1 año de edad con 120 Kg de peso.

### Asnos:

- a) Hembra de 2 años de edad con 100 Kg de peso.
- b) Hembra de 2 años y medio de edad con 100 Kg de peso.
- c) Macho de 1 año de edad con 100 Kg de peso.

### I.- Prueba biológica con la micotoxina.

Para esta prueba se utilizaron los caballos a los cuales se les dosificó con cápsulas que contenían la micotoxina encontrada en la cromatografía de capa fina.

Se utilizaron 2 micotoxinas, la micotoxina encontrada en el alimento contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de leucoencefalomalacia (LEM) y la micotoxina encontrada en el alimento contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de edema cerebral (EC).

La micotoxina se encapsuló junto con el gel de sílice como excipiente con un total de 20 mg por cápsula.

El peso conjunto del gel de sílice y la micotoxina se tomó como la cantidad específica de dosificación de la micotoxina ya que la cromatografía de capa fina da cantidades de partes por billón de micotoxina que solo pueden ser cuantificadas por métodos más sofisticados como la espectrometría de masas.

Se dosificaron las micotoxinas a 2 caballos (a y b) dejando 1 como testigo (c).

#### Dosificación:

De los estudios realizados sobre la leucoencefalomalacia y el edema cerebral en distintas partes del mundo, no existe ningún trabajo acerca del uso de micotoxinas para reproducir estas encefalopatías, siendo en esta ocasión la primera vez que se lleva a cabo se dosificó al azar para encontrar una dosis que reprodujera los síntomas y lesiones cerebrales que producen estas enfermedades.

1.-Se dosificaron 55 cápsulas (1 100 mg= 1.1 g) de la micotoxina encontrada en el alimento contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de leucoencefalomalacia equina, vía oral, al caballo "a" durante 31 días, de la siguiente manera:

Primeros días,	13 días	1 cápsula diaria
Subsecuentes	18 días	2 cápsulas diarias
Total =		31 días 55 cápsulas

2.-Se dosificaron 45 cápsulas (900 mg= 0.9 g) de la micotoxina encontrada en el alimento contaminado procedente de

lugares donde se reportaron brotes de edema cerebral equino, vía oral, al caballo "b", durante 29 días de la siguiente manera:

Primeros días,	23 días	1 cápsula diaria
Subsecuentes	4 días	3 cápsulas diarias
"	2 días	5 cápsulas diarias
Total =		29 días 45 cápsulas

3.-El caballo "c" que se utilizó como testigo fue alimentado con alimento limpio (paja y maíz).

## II.-Prueba biológica con el alimento contaminado.

Para esta parte experimental se utilizaron los asnos.

A los asnos "a" y "b" se les dió alimento contaminado - procedente de Tecolotlán, Jalisco donde se reportó un brote de leucoencefalomalacia.

El alimento utilizado consistió de maíz en mazorca.

El asno "c" se utilizó como testigo y fue alimentado con alimento limpio (paja y maíz).

En este experimento la dosificación fue ad libitum durante 30 días.

### Elaboración de las cápsulas:

Se raspó el gel de sílice que contenía a la micotoxina.

Posteriormente, se pesaron 20 mg de la muestra en una balanza analítica marca Mettler.

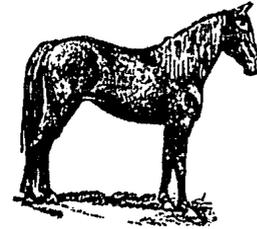
Finalmente, la muestra se colocó en una cápsula vacía, - las cápsulas fueron adquiridas de la droguería Cosmopolita S.A.

Este experimento se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. y fue supervisado por la Dra. Reyna Sánchez San Martín del Departamento de Patología de la mencionada Facultad.

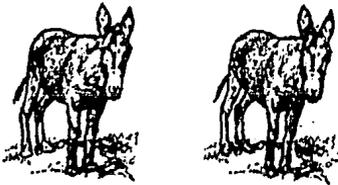
## PRUEBA BIOLÓGICA



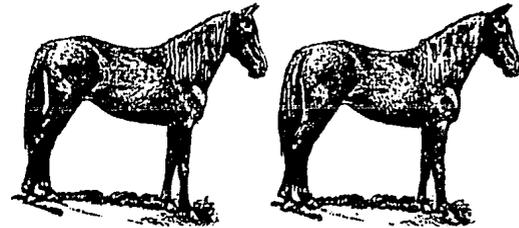
TESTIGO



TESTIGO



+ ALIMENTO CONTAMINADO QUE  
CAUSÓ BROTES DE LEUCOENCE-  
FALOMALACIA.



+ MICOTOXINA AISL  
LADA DE ALIMENTO  
CONTAMINADO QUE  
CAUSÓ LEUCOENCE-  
FALOMALACIA.

+ MICOTOXINA AISL  
LADA DE ALIMENTO  
CONTAMINADO QUE  
CAUSÓ EDEMA CERE  
BRAL.

Figura 13: Prueba Biológica.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### Aislamiento del hongo.

En el análisis de la micoflora de las muestras de alimento contaminado (ver Tabla 6) se encontraron hongos de los géneros Alternaria, Aspergillus y Fusarium.

La muestra 1 resultó negativa al crecimiento de micoflora en el medio de cultivo, esto indica que este alimento - analizado a pesar de ser de un lugar donde se reportó un brote de leucoencefalomalacia (ver Tabla 5) no fue la causa de la enfermedad, pero sin embargo fue muestreado por encontrarse ahí.

El género Aspergillus únicamente se encontró en las muestras 2 y 3, y el género Alternaria en la muestra 8.

Fusarium resultó el hongo predominante en las muestras analizadas ya que se encontró presente en todas ellas.

Así, Fusarium se presentó en un 92% en las muestras analizadas, Aspergillus en un 17% y Alternaria en un 8% respectivamente.

Tomando en cuenta únicamente las muestras de maíz (3-7, 9-12) encontramos que Fusarium se presentó en un 100% como el hongo predominante en la micoflora.

Cuando el género Fusarium fue aislado, purificado y cultivado en los medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Papa-Sucrosa-Agar (PSA) y Cloruro de Potasio-Agar (KCl-Agar), se encontraron diferencias en el crecimiento micelial cuando se observaron las colonias a los 7 días de crecimiento.

En el medio de cultivo PDA el micelio apenas alcanzaba a cubrir toda el área de la caja de Petri, su espesor era de aproximadamente 2 a 3 mm y presentaba coloración.

Tabla 6: Resultados de la micoflora encontrada en las muestras de alimento contaminado.

MUESTRA	PROCEDENCIA	ENFERMEDAD REPORTADA	SIEMBRA EN PDA	GENEROS IDENTIFICADOS	IDENTIFICACION POR COLORACION*	ESPECIES IDENTIFICADAS
No. 1 Cebada	Tantoyuca, Edo. de México	L.E.M.E.	Sin micoflora	---	---	---
No. 2 Cebada	Tantoyuca, Edo de México	L.E.M.E.	2 colonias	<u>Fusarium</u> sp. <u>Aspergillus</u> sp.	F <u>acuminatum</u> F <u>avenaceum</u>	F. <u>moniliforme</u>
No. 3 Maíz tri- llado	Tantoyuca, Edo de México	L.E.M.E.	2 colonias	<u>Fusarium</u> sp. <u>Aspergillus</u> sp.	F <u>avenaceum</u> F <u>nivale</u>	F. <u>subglutinans</u>
No. 4 Maíz en mazorca	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	1 colonia	<u>Fusarium</u> sp.	F <u>graminearum</u> F <u>sambucinum</u>	F. <u>subglutinans</u>
No. 5 Maíz en mazorca	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	1 colonia	<u>Fusarium</u> sp.	F <u>avenaceum</u> F <u>moniliforme</u> F <u>sporotrichioides</u> F <u>subglutinans</u>	F. <u>moniliforme</u>
No. 6 Maíz en mazorca	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	1 colonia	<u>Fusarium</u> sp.	F <u>avenaceum</u> F <u>moniliforme</u> F <u>sporotrichioides</u> F <u>subglutinans</u>	F. <u>moniliforme</u>
No. 7 Maíz en mazorca	Tianguistengo, Edo. de México	E.C.E.	1 colonia	<u>Fusarium</u> sp.	F <u>avenaceum</u> F <u>moniliforme</u> F <u>sporotrichioides</u> F <u>subglutinans</u>	F. <u>moniliforme</u>

Tabla 6: Continuación.

MUESTRA	PROCEDENCIA	ENFERMEDAD REPORTADA	SIEMBRA EN PDA	GENEROS IDENTIFICADOS	IDENTIFICACION POR COLORACION*	ESPECIES IDENTIFICADAS
No. 8 Cebada	Atizapan de Zaragoza, Edo de México	Hemorragia cerebral	2 colonias	<u>Fusarium</u> sp. <u>Alternaria</u> sp.	<u>F. acuminatum</u> <u>F. avenaceum</u>	<u>F. moniliforme</u>
No. 9 Maíz en mazorca	Tecolotlán, Jalisco	L.E.M.E.	1 colonia	<u>Fusarium</u> sp.	<u>F. avenaceum</u> <u>F. moniliforme</u> <u>F. nivale</u> <u>F. sporotrichioides</u> <u>F. subglutinans</u>	<u>F. moniliforme</u>
No. 10 Maíz en mazorca	Tecolotlán, Jalisco	L.E.M.E.	1 colonia	<u>Fusarium</u> sp.	<u>F. avenaceum</u> <u>F. moniliforme</u> <u>F. sporotrichioides</u> <u>F. subglutinans</u>	<u>F. moniliforme</u>
No. 11 Maíz desgranado	Tecolotlán, Jalisco	L.E.M.E.	1 colonia	<u>Fusarium</u> sp.	<u>F. avenaceum</u> <u>F. moniliforme</u> <u>F. sporotrichioides</u> <u>F. subglutinans</u>	<u>F. anthophilum</u>
No. 12 Maíz molido	Tecolotlán, Jalisco	L.E.M.E.	1 Colonia	<u>Fusarium</u> sp.	<u>F. clamidosporum</u> <u>F. oxysporum</u>	<u>F. moniliforme</u>

PDA: Papa-Dextrosa-Agar.

L.E.M.E.: Leucoencefalomalacia equina.

E.C.E.: Edema Cerebral equino.

\*: Identificación parcial en base a la coloración de la colonia (Nelson, et al., 1983).

En el medio de cultivo PSA se observó un gran crecimiento micelial, éste cubrió toda el área de la caja, presentó un espesor de aproximadamente 7 a 8 mm y no presentaba coloración, todos los medios eran de color blanco.

Fisher, et al., 1983, reportó un buen desarrollo de cadenas de microconidios del género Fusarium en el medio de cultivo KCl-Agar, sin embargo, en este trabajo el medio de cultivo presentó un escaso crecimiento micelial, éste apenas se notaba sobre el medio en forma de una tenue red.

Para la identificación preliminar a nivel de especie por coloración de la colonia (ver Tabla 6), el medio de cultivo PDA resultó ser el más adecuado, además de que en este medio algunas especies presentan una coloración particular (Nelson, et al., 1983).

Se consideró pertinente incluir la columna de "identificación por coloración" dentro de la Tabla 6 ya que en el libro de Nelson, et al., 1983, viene una escala precisa de colores de colonias de Fusarium en PDA, y como el color es variable según el medio de cultivo, pues es útil establecer con exactitud cuál presentaba nuestro cultivo.

Sin embargo, hay que estar claros en que el hongo identificado es lo válido ya que en ocasiones no coinciden la columna de "identificación por coloración" y de "especies identificadas", siendo estas últimas las que hay que considerar como verdaderas y se dejará la columna de "identificación por coloración" como una apreciación macroscópica de referencia y no es que se hubieran obtenido estas especies en realidad en la micoflora.

### Determinación del hongo.

De los 3 medios de cultivo utilizados para la determinación a nivel de especie del género Fusarium el PDA resultó ser el mejor ya que al realizar las observaciones bajo el microscopio las estructuras reproductoras (conidióforos, microconidios y macroconidios) presentaron un mejor desarrollo y pudieron apreciarse fácilmente.

En el medio de cultivo PSA a pesar del gran crecimiento y número de hifas, los conidióforos eran escasos y no se podían distinguir fácilmente.

En el medio de cultivo KCl-Agar se observó un escaso número de hifas, casi no se observaron conidióforos, a pesar de que hubo un buen desarrollo de macroconidios.

Basándose en el manual de identificación de Fusarium de Nelson, et al., 1983, se determinaron las especies Fusarium anthophilum, Fusarium subglutinans y Fusarium moniliforme (ver Tabla 6).

Fusarium moniliforme Sheldon. fue identificado con base en el tamaño y la forma de los microconidios y macroconidios; presencia de cadenas de microconidios; presencia de monofiálides y ausencia de polifiálides y clamidosporas - (ver Figura 14 y 15).

Fusarium subglutinans (Wollenw & Rinking) Nelson, Toussoun & Marasas comb. nov. fue identificado con base en el tamaño y forma de los microconidios y macroconidios; - ausencia de cadenas de microconidios; presencia de monofiálides y polifiálides, y ausencia de clamidosporas (ver Figura 16 y 17).

La ausencia de cadenas de microconidios y la presencia de polifiálides en Fusarium subglutinans son caracterís-

ticas que utilizan Nelson, et al., 1983, para elevar a rango de especie a Fusarium moniliforme Sheldon var. Subglutinans Wollenw & Reinking.

Fusarium anthophilum (A. Braun) Wollenw fue identificado con base en el tamaño y forma de los microconidios (ovales y piriformes) y macroconidios; presencia de monofiálides y polifiálides, y ausencia de clamidosporas (ver Figura 18 y 19).

F. moniliforme fue encontrado en las muestras que reportaron leucoencefalomalacia (2,9,10 y 12), edema cerebral - (5-7) y hemorragia cerebral (8). F. subglutinans fue encontrado en las muestras que reportaron leucoencefalomalacia (3) y edema cerebral (4). Y F. anthophilum apareció en la muestra 11 donde se reportó leucoencefalomalacia (ver Tabla 6).

Finalmente se puede observar que las especies F. moniliforme y F. subglutinans se encuentran implicadas en alimento contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de leucoencefalomalacia y edema cerebral en equinos.

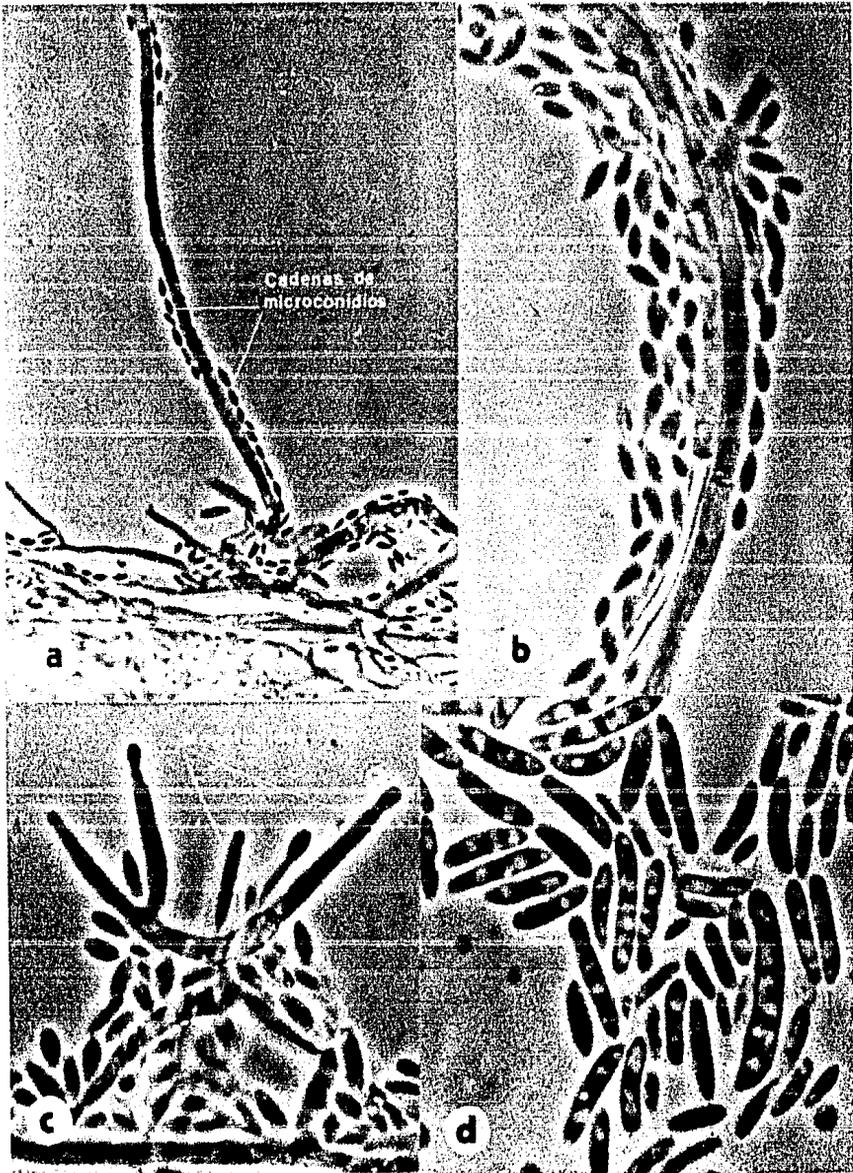


Figura 14. *Fusarium moniliforme*: a,b, cadenas de microconidios; c, monofiálides; d, macroconidios y microconidios (a 505x, b-d 1250x).

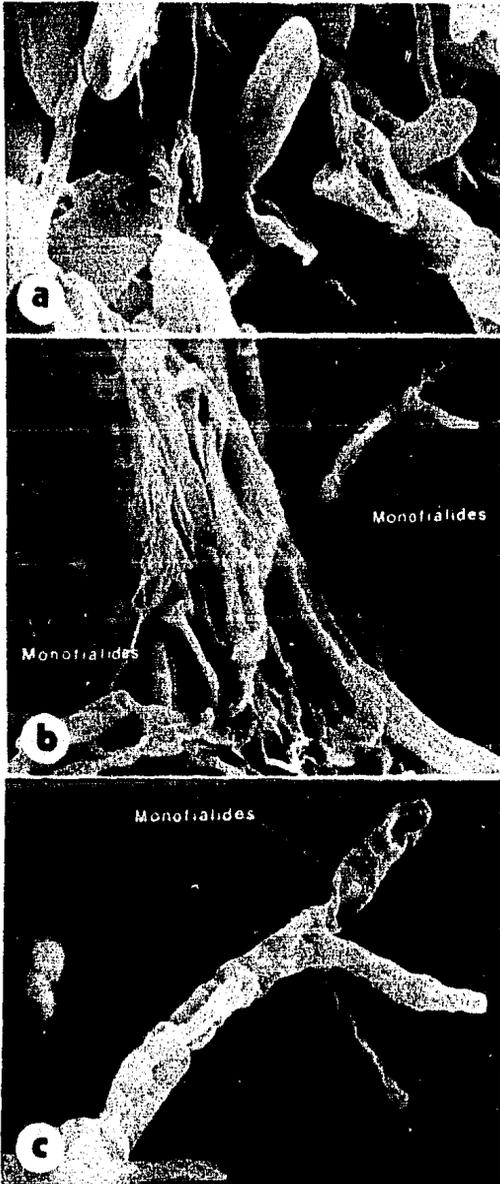


Figura 15. *Fusarium moniliforme*: a, microconidios; b, c, monofialides (a 4000x, b 1600x, c 4400x).

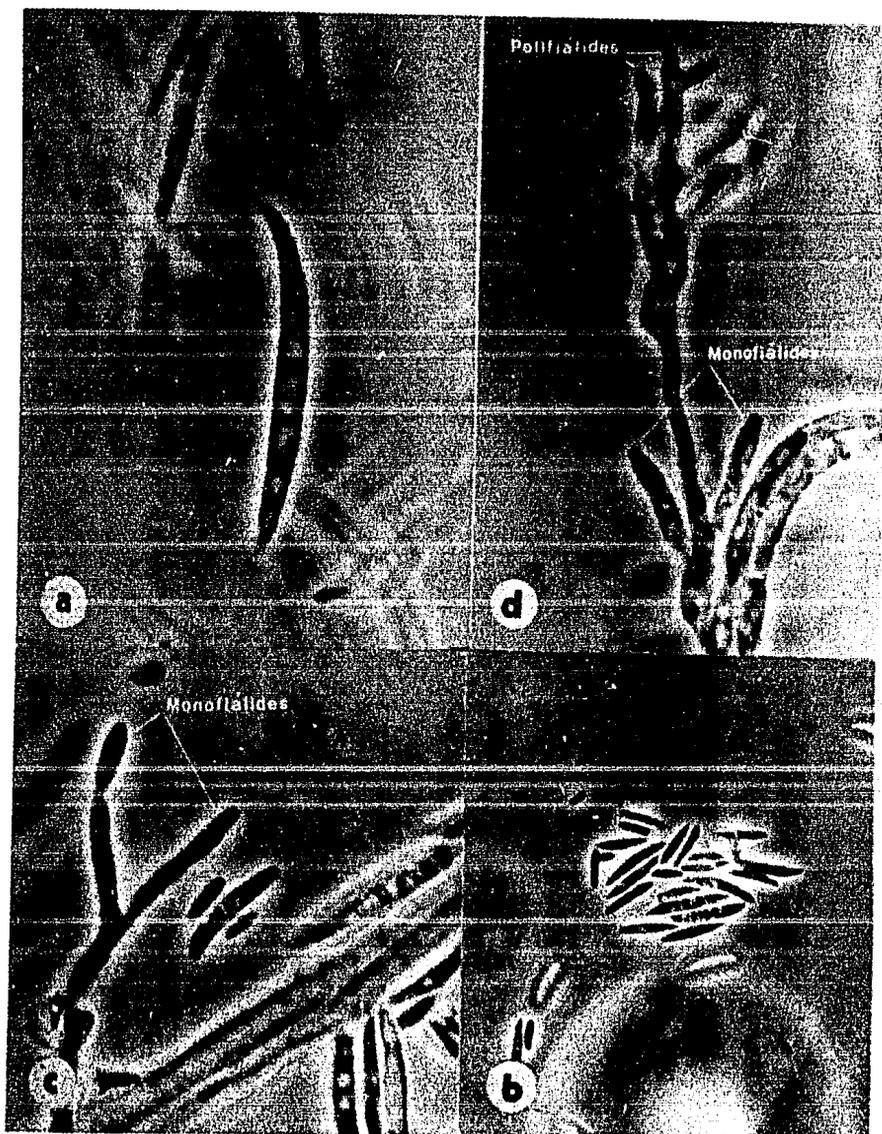


Figura 16. *Fusarium subglutinans*: a,b, macroconidios y microconidios; c,d, monofialides y polifialides ( a 1250x, b 505x, c,d 1250x ).



Figura 17. Fusarium subglutinans: microconidios.  
4400x

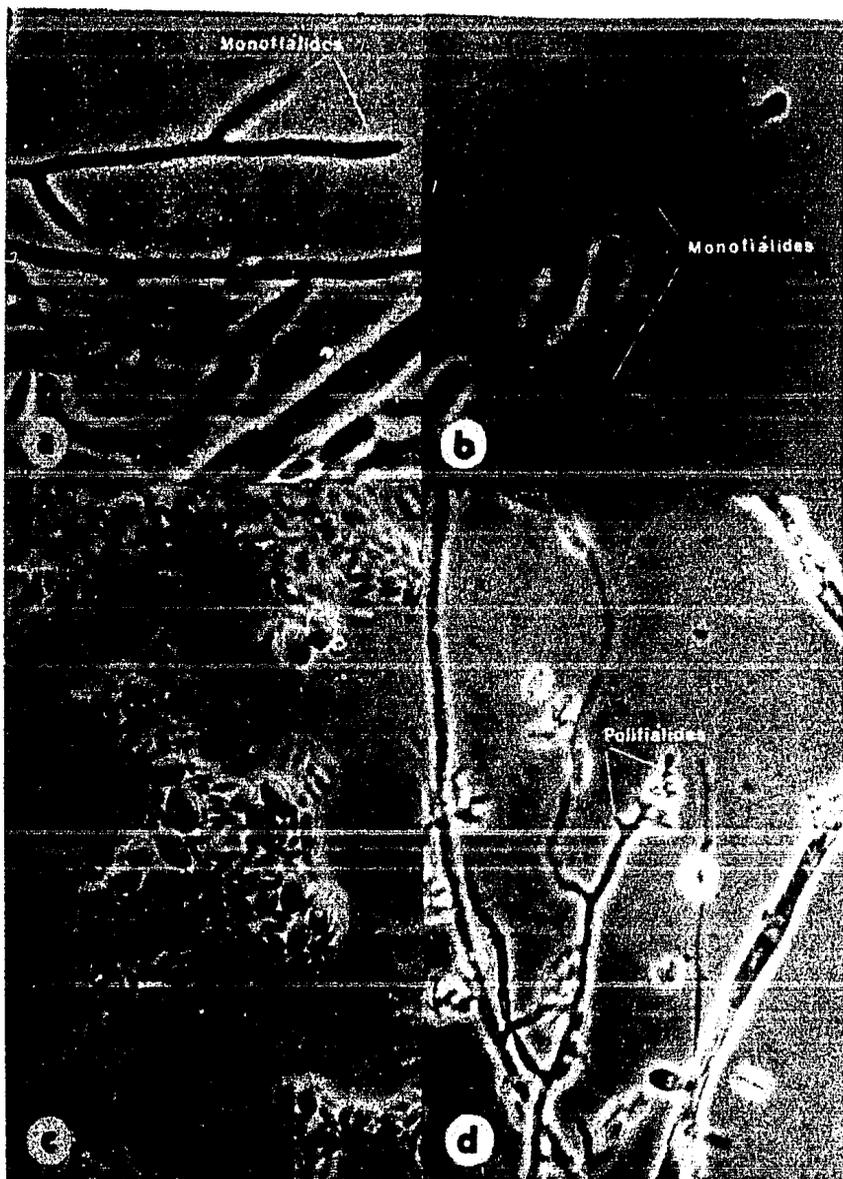


Figura 18. *Fusarium anthophilum*: a,b monofiálides; c, microconidios (ovales y piriformes); d, polifiálides (a,b 1250x, c,d 505x).



Figura 19. *Fusarium anthophilum*; a, monofiálides; b, microconidios (a 1800x, b 1800x).

### Extracción de micotoxinas.

Se utilizaron las técnicas de extracción de micotoxinas de Stoloff, et al. (1971), Thomas, et al. (1975) y Romer (1986) para abarcar el mayor número de posibles micotoxinas que pudieran estar implicadas en el alimento contaminado que fue analizado.

Al término de las extracciones, como resultado, se observó que los tres métodos son muy efectivos ya que los estándares presentaron una buena fluorescencia cuando las placas se observaron bajo luz ultravioleta.

No se detectaron aflatoxinas, zearalenona ni tricotecenos tipo A (ver Tabla 7) en las muestras analizadas, sin embargo en los cromatogramas de las técnicas aparecieron 2 manchas que correspondieron según la técnica de Romer (1986) a tricotecenos tipo B (ver Tabla 7) dando como resultado que las técnicas de Stoloff, et al. (1971) y Thomas, et al. (1975) también pueden extraer micotoxinas del grupo de los tricotecenos. Sin embargo, la técnica de Romer (1986) que es específica para tricotecenos extrae una mayor cantidad de estos (ver Tabla 7) y detecta de qué tipo son (A ó B).

Comparando las 3 técnicas de extracción en cuanto a tiempo de extracción por muestra, costo y riesgo de trabajo se encontró que:

El método de Stoloff, et al. (1971) requiere de 80 minutos para su realización, tiene un costo aproximado de 5.80 dólares U.S. (Pereda, 1987) y un alto riesgo de trabajo por utilizarse sustancias muy tóxicas (acetónitrilo, éter de petróleo y cloroformo).

Tabla 7: Micotoxinas obtenidas en la cromatografía de capa fina.

Técnica de extracción	Muestra	Micotoxinas											
		Aflatoxinas				Zea- rale nona	Tricotecenos						
		B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>		Tipo A		Tipo B				
							T-2	DAS	DON	MD <sub>1</sub>	Rf <sub>X</sub>	MD <sub>2</sub>	Rf <sub>X</sub>
Stoloff, et al., 1971.	testigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.92	+	0.71
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.92	+	0.72
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Thomas, et al., 1975.	testigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.90	+	0.71
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.90	+	0.72
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.71
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.90	+	0.71
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.90	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Romer, 1986.	testigo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.88	+	0.74
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.74
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.87	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.87	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.89	+	0.74
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	9	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.86	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.86	-	-
	11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.86	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	+	0.87	-	-

T-2= Toxina T-2

DAS= Diacetoxiscirpenol

DON= Deoxinivalenol

MD<sub>1</sub>= Mancha desconocida #1MD<sub>2</sub>= Mancha desconocida #2

Rf= Factor de retardación

Rf<sub>X</sub> de los estándares utilizados:B<sub>1</sub> = 0.44

Z = 0.80

B<sub>2</sub> = 0.41

T-2 = 0.26

G<sub>1</sub> = 0.40

DAS = 0.21

G<sub>2</sub> = 0.36

DON = 0.68

El método de Thomas, et al. (1975) requiere de 70 minutos para su realización, tiene un costo aproximado de 1.78 dólares U.S. (Pereda, 1987) y un moderado riesgo de trabajo por utilizarse solamente cloroformo y hexano como sustancias tóxicas.

El método de Romer (1986) requiere de 40 minutos para su realización, tiene un costo aproximado de 6 dólares U.S. - (el costo se da en dólares para poder precisar en cualquier fecha su costo real en moneda nacional) y un alto riesgo de trabajo por utilizarse sustancias muy tóxicas (acetato de etilo, acetronitrilo, tolueno, cloroformo, ácido fórmico y ácido sulfúrico).

#### Identificación de micotoxinas.

Al realizar la cromatografía de capa fina no se detectaron aflatoxinas ni zearalenona. En los cromatogramas correspondientes a las técnicas de extracción de Stoloff, et al. (1971) y Thomas, et al. (1975) se encontraron en algunas muestras analizadas, principalmente la muestra 2 y 4 (ver Tabla 7), dos manchas fluorescentes que no correspondieron a los estándares, una mancha ( $Rf_{\bar{X}} = 0.71$  a  $0.72$ ) por abajo de la zearalenona ( $Rf_{\bar{X}} = 0.80$ ) y una arriba ( $Rf_{\bar{X}} = 0.90$  a  $0.92$ ) de ésta.

Como el género Fusarium produce principalmente micotoxinas del grupo de los tricotecenos (Marasas, et al., 1984) se procedió a realizar la técnica de Romer (1986), la cual es específica para este grupo de micotoxinas. Cuando se realizó esta técnica el cromatograma correspondiente a los tricotecenos tipo A resultó negativo (ver Tabla 7) ya que

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

solo aparecieron los estándares utilizados (Toxina T-2 y Diacetoxiscirpenol). En el cromatograma correspondiente a los tricotecenos tipo B aparecieron nuevamente estas dos manchas, pero en este caso se detectó un mayor número de éstas y se presentó una ligera variación en los valores de Rf (ver Tabla 7).

El valor de Rf de la mancha fluorescente catalogada como mancha desconocida # 1 bajó ligeramente ( $Rf_{\bar{X}} = 0.86$  a  $0.89$ ) con respecto al valor obtenido anteriormente ( $Rf_{\bar{X}} = 0.90$  a  $0.92$ ), y el Rf correspondiente a la mancha fluorescente catalogada como mancha desconocida # 2 subió ligeramente ( $Rf_{\bar{X}} = 0.74$ ) también con respecto al valor obtenido anteriormente ( $Rf_{\bar{X}} = 0.71$  a  $0.72$ ). Ver Tabla 7

Esta variación en los valores de Rf se debe a la diferencia que existe entre la técnica de Romer (1986) con las de Stoloff, et al. (1971) y Thomas, et al. (1975), en la metodología y desarrollo de la cromatografía de capa fina, como ejemplo se puede citar el uso de diferentes de sarrolladores de micotoxinas (ver técnicas de extracción).

Las dos manchas fluorescentes se catalogaron como tricotecenos tipo B ya que sólo aparecieron en la placa correspondiente a este tipo de tricotecenos (ver Tabla 7).

Estas micotoxinas aparecieron en las muestras que reportaron brotes de leucoencefalomalacia (2,9-12) y Edema cerebral (4,6,7), siendo en las muestras 2 y 4 donde estas dos micotoxinas aparecieron en los cromatogramas de las tres técnicas de extracción (ver Tabla 7).

Los valores de Rf de los estándares utilizados no correspondieron con los citados en la técnica (ver Tabla 8). Romer (1986) menciona que los valores de Rf varían pero la secuencia siempre es la misma, esto es, para los tricote-

Tabla 8: Comparación de los valores de Rf obtenidos de los Tricotecenos utilizados con otros valores teóricos.

Tricotecenos		Rf <sup>a</sup>	Rf <sup>b</sup>	Rf <sup>c</sup>
Tipo A	Toxina T-2	0.34	0.26	—
	Diacetoxiscirpenol	0.27	0.21	—
	Toxina HT-2	0.17	—	—
	Neosolaniol	0.13	—	0.15
Tipo B	Fusarenona X	0.69	—	0.31
	Deoxinivalenol	0.50	0.68	—
	Nivalenol	0.19	—	0.05

Rf<sup>a</sup> = Valores de Rf según Romer (1986) con desarrollador tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico al 90% (6:2:1 v/v/v) para tricotecenos tipo A y desarrollador acetato de etilo-metanol (20:1 v/v) para tricotecenos tipo B.

Rf<sup>b</sup> = Valores de Rf de los estándares obtenidos en la presente tesis bajo la técnica de Romer, 1936.

Rf<sup>c</sup> = Valores de Rf según Purchase (1974) con desarrollador acetato de etilo-hexano (3:1 v/v) para ambos tipos de tricotecenos.

men de cada una de las 2 micotoxinas desconocidas.

Es importante señalar que era más factible analizar las micotoxinas encontradas con la técnica de Romer (1986), - pero el inconveniente que se presentó fue que esta técnica requiere de la aplicación de una solución Cloruro de - Aluminio-metanol la cual queda impregnada en la placa (ver técnica de Romer, 1986). Estos compuestos se mezclan con las micotoxinas en el momento de separar éstas del gel de sílice y al ser analizadas por espectroscopía infrarroja interferirían en las bandas correspondientes a los grupos funcionales de las micotoxinas.

De los cromatogramas con la técnica de Thomas, et al. - (1975), se purificaron las micotoxinas correspondientes a la muestra 2 (que causó brotes de leucoencefalomalacia equina) y muestra 4 (que causó brotes de edema cerebral equino). Se trabajó con estas micotoxinas porque aparecen en los cromatogramas de las tres técnicas de extracción y representan las dos enfermedades reportadas.

Se obtuvieron cuatro micotoxinas purificadas; de la muestra 2 la micotoxina correspondiente a la mancha desconocida # 1 ( $Rf_{\bar{X}} = 0.90$ ) y la correspondiente a la mancha desconocida # 2 ( $Rf_{\bar{X}} = 0.71$ ); y de la muestra 4 la micotoxina correspondiente a la mancha desconocida # 1 ( $Rf_{\bar{X}} = 0.90$ ) y la correspondiente a la mancha desconocida # 2 ( $Rf_{\bar{X}} = 0.72$ ) - ver Tabla 7.

Al realizar la espectroscopía infrarroja se detectaron - en los espectrogramas de los estándares de los tricoteceños las bandas correspondientes a los grupos funcionales - de las moléculas de estas micotoxinas (ver Figura 20, 21 y 22).

cenos tipo A la Toxina T-2 siempre presentará el valor Rf más alto seguida del Diacetoxiscirpenol, Toxina HT-2 y el Neosolanol respectivamente, para los tricotecenos tipo B Fusarenona X tendrá el valor de Rf más alto seguido del Deoxinivalenol y el Nivalenol (ver Tabla 8).

En los resultados se observó esta secuencia, la Toxina T-2 presentó el valor de Rf más alto ( $Rf_{\bar{X}} = 0.26$ ) seguida del Diacetoxiscirpenol ( $Rf_{\bar{X}} = 0.21$ ). Ver Tabla 8

Tomando en cuenta la diferencia (0.19) entre los valores de Rf (dados por Romer, 1986) de la Fusarenona X ( $Rf = 0.69$ ) y el Deoxinivalenol ( $Rf = 0.50$ ), el valor de Rf de la Fusarenona X en este trabajo correspondería a un  $Rf = 0.87$  a partir de la suma de esta diferencia con el valor de Rf obtenido para el Deoxinivalenol ( $Rf_{\bar{X}} = 0.68$ ) ver Tabla 8.

Con base en lo anterior la mancha desconocida # 1 ( $MD_1$ ) corresponde a la micotoxina Fusarenona X, ya que el valor teórico de Rf sacado para ésta ( $Rf = 0.87$ ) entra dentro del rango de valores de Rf de la  $MD_1$  ( $Rf_{\bar{X}} = 0.86$  a  $0.89$ ) - ver Tabla 7.

La mancha desconocida # 2 ( $MD_2$ ) no se pudo identificar en la cromatografía de capa fina.

Estas dos micotoxinas encontradas en la cromatografía de capa fina  $MD_1$  y  $MD_2$  fueron analizadas por la técnica de espectroscopía infrarroja para detectar los grupos funcionales característicos de las moléculas de estas micotoxinas e identificarlas mediante estos grupos funcionales.

Las micotoxinas analizadas por esta técnica fueron purificadas (ver técnica de espectroscopía infrarroja) a partir de los cromatogramas de la técnica de Thomas, et al. (1975) pues esta técnica permitió obtener un mayor volu--

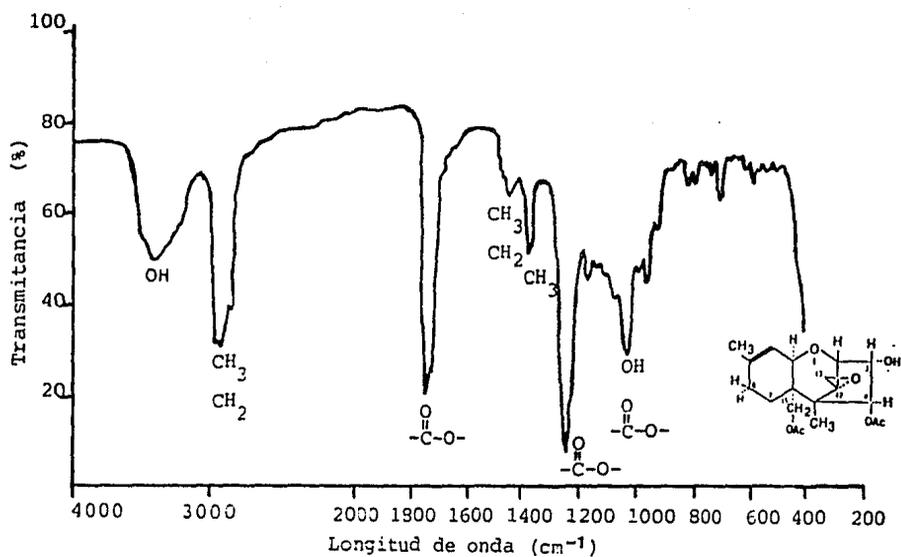


Figura 20: Espectrograma infrarrojo de la micotoxina Diacetoxiscirpenol (DAS).  
(Tricoteceno tipo A)

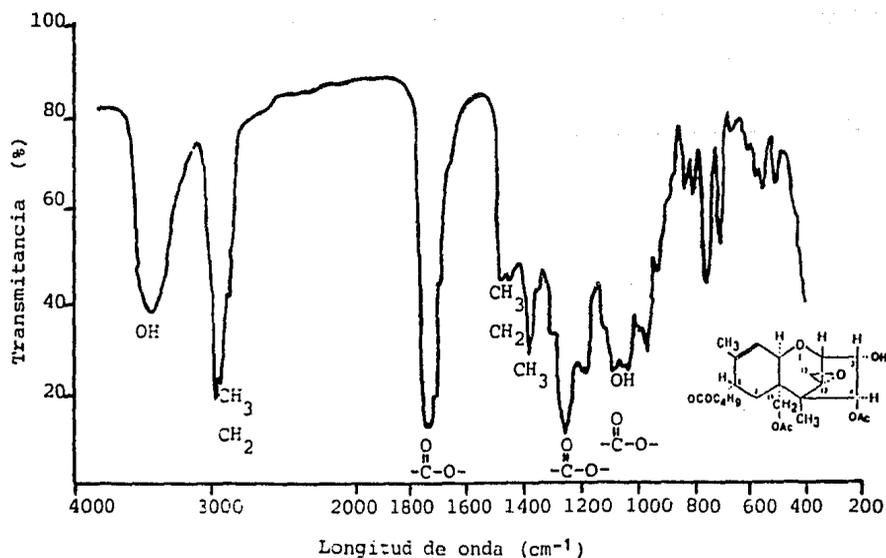


Figura 21: Espectrograma infrarrojo de la micotoxina T-2.  
(Tricoteceno tipo A)

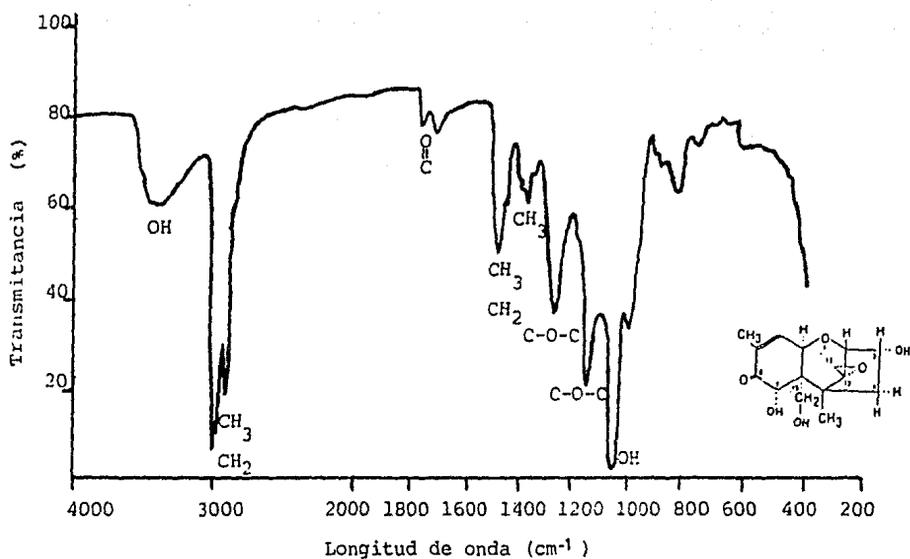


Figura 22: Espectrograma infrarrojo de la micotoxina Deoxinivalenol (DON).  
(Tricoteceno tipo B)

En los espectrogramas del Diacetoxiscirpenol y de la Toxina T-2 (ver Figuras 20 y 21) se encontraron las bandas correspondientes a los grupos hidroxilo (OH), metilos y metilenos ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ) y carbonilos del grupo éster ( $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-$ ), los cuales corresponden a los grupos funcionales que caracterizan a estas dos moléculas.

El Deoxinivalenol en el espectrograma infrarrojo (ver Figura 22) presentó las bandas correspondientes a los grupos hidroxilo (OH), metilos y metilenos ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ) y grupos éster ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) que caracterizan a los grupos funcionales de esta molécula. También se observó que no aparecieron bandas correspondientes a carbonilos del grupo éster que caracterizan en general a los tricotecenos tipo A (comparar Figuras 20 y 21 con la Figura 22). Además apareció una pequeña banda que representa un doble enlace Carbono-Oxígeno ( $\text{C}=\text{O}$ ) que podría corresponder al que presenta la molécula de esta micotoxina (ver Figuras 6 y 22).

El espectrograma de la micotoxina correspondiente a la mancha desconocida # 1 de la muestra 2 (ver Figura 23) presentó bandas de los grupos metilos y metilenos ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ), éster ( $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) y carbonilos del grupo éster ( $-\overset{\text{O}}{\text{C}}-\text{O}-$ ). Además apareció una pequeña banda que representa un doble enlace Carbono-Oxígeno ( $\text{C}=\text{O}$ ) y una ligera tendencia a formar una banda del grupo hidroxilo (OH). Este espectrograma es muy similar al de la micotoxina de la mancha desconocida # 1 de la muestra 4 (ver Figura 24) pues los principales grupos funcionales se encuentran localizados en las mismas bandas, a diferencia de que en el espectro de la muestra 4 las bandas correspondientes al doble enlace Carbono-Oxígeno y a los grupos metilenos y metilos están más acentua-

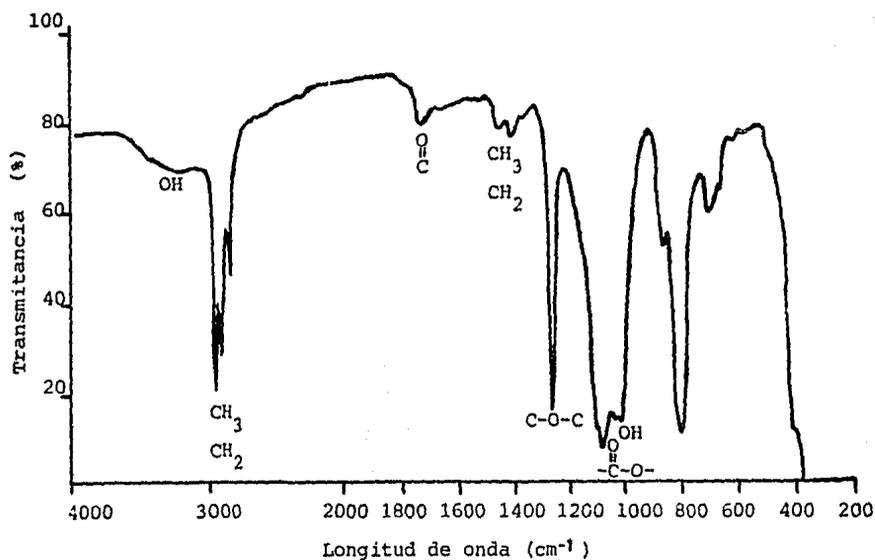


Figura 23: Espectrograma infrarrojo de la micotoxina correspondiente a la mancha desconocida # 1 de la muestra 2 que causó brotes de Leucoencefalomalacia equina.

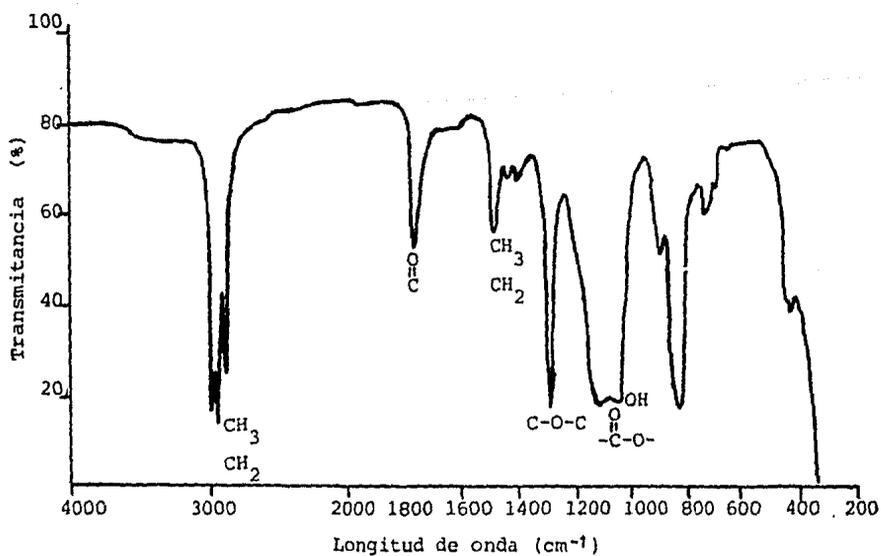


Figura 24: Espectrograma infrarrojo de la micotoxina correspondiente a la mancha desconocida # 1 de la muestra 4 que causó brotes de Edema cerebral equino.

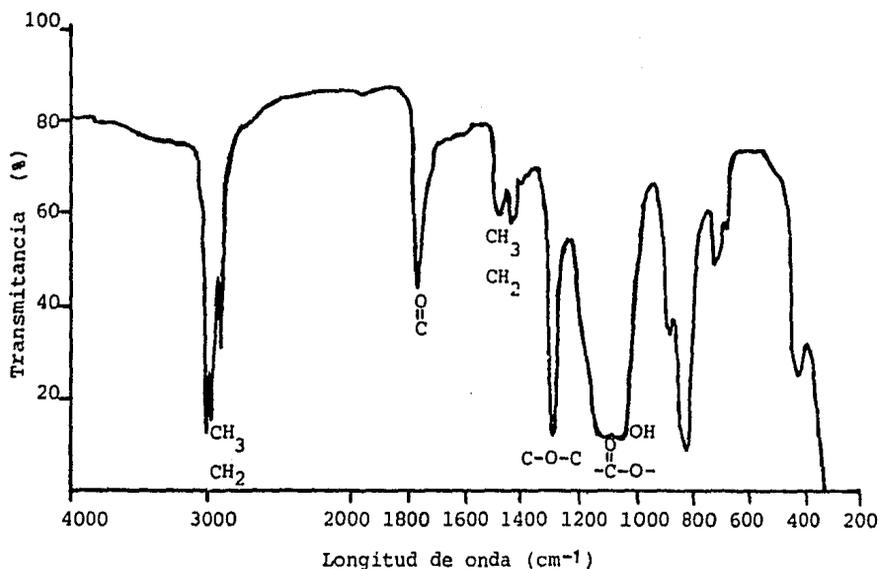


Figura 25: Espectrograma infrarrojo de la micotoxina correspondiente a la mancha desconocida # 2 de la muestra 2 que causó brotes de Leucoencefalomalacia equina.

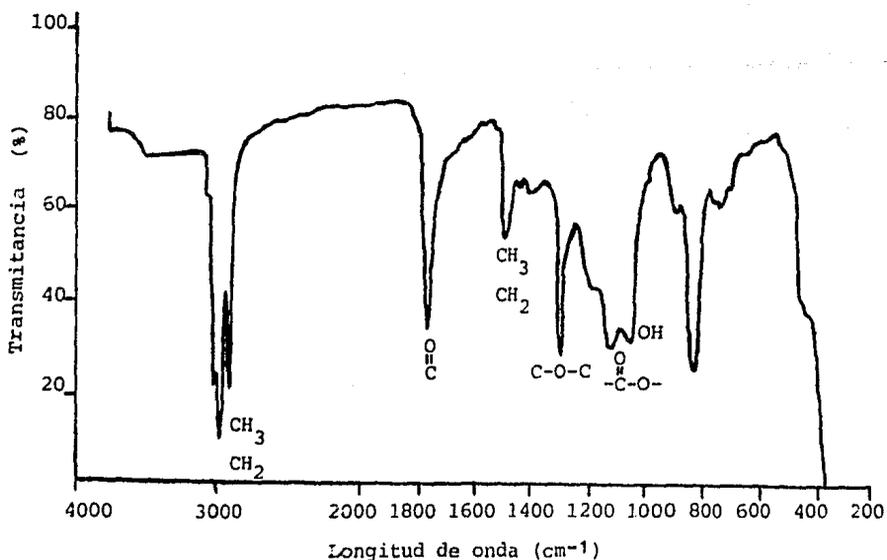


Figura 26: Espectrograma infrarrojo de la micotoxina correspondiente a la mancha desconocida # 2 de la muestra 4 que causó brotes de Edema cerebral equino.

das que en la muestra 2. Las variaciones entre los dos espectrogramas se deben a que las micotoxinas no presentan una pureza del 100% como los estándares.

La cromatografía de capa fina mostró que estas micotoxinas son tricotecenos tipo B y el análisis de espectroscopía infrarroja detectó una banda correspondiente al carbonilo del grupo éster que sólo se encuentra presente como grupo funcional en la Fusarenona X (ver Figura 6) en los tricotecenos tipo B.

Por lo tanto, este análisis al igual que la cromatografía de capa fina indican que estas dos micotoxinas aunque tienen el mismo Rf no son la misma sino diferentes, pero ambas se asemejan a la estructura de la Fusarenona X.

Las micotoxinas correspondientes a la mancha desconocida # 2 de las muestras 2 y 4 (ver Figuras 25 y 26) presentaron en el espectrograma los grupos metilos y metilenos ( $\text{CH}_3$  y  $\text{CH}_2$ ), éter (C-O-C), carbonilos del grupo éster ( $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$ ), hidroxilos (OH) y doble ligadura Carbono-Oxígeno (C=O), localizados en las mismas bandas, diferenciándose en la intensidad de algunas de estas bandas. Esta diferencia se atribuye a que aunque son moléculas similares no son la misma aunque tengan igual Rf.

Estas dos micotoxinas al igual que las correspondientes a la mancha desconocida # 1 presentaron un grupo carbonilo del éster que también se representa en la Fusarenona X, sin embargo éstas presentaron un Rf muy bajo en la cromatografía de capa fina (ver Tabla 7), por tanto estas corresponden a otras micotoxinas (ver Tabla 2).

Un análisis químico que identifica plenamente los componentes de una molécula es la espectrometría de masas. Se

realizó este proceso de identificación resultando negativo porque la cantidad de muestra de las micotoxinas analizadas fue insuficiente para ser detectadas por el espectrómetro de masas.

Por la estructura de las micotoxinas encontradas se deduce que no puede ser la moniliformina como se creía,

### Estudio microscópico de cerebros de equinos.

El estudio de microscopía electrónica de transmisión reveló diferencias microestructurales entre el material sano (cerebro de caballo sano) y el material con lesiones de - leucoencefalomalacia y edema cerebral (cerebro de caballo con leucoencefalomalacia y cerebro de caballo con edema - cerebral).

Para una buena observación de las diferencias entre los cerebros con lesiones de las enfermedades y el cerebro sano, se compararon 3 zonas, una de cada cerebro, para apreciar los daños estructurales.

La zona correspondiente al cerebro con Edema cerebral - (Figura 27) presentó hinchamiento de mielina; fragmenta--ción de algunas fracciones de mielina y degeneración del axón. Además se observó disociación de los grupos mielínicos con pérdida de la morfología de áreas de sustancia blanca debida a la presencia de un material homogéneo distribuido entre estos grupos mielínicos.

La zona correspondiente al cerebro con leucoencefaloma- lacia (Figura 28) presentó pérdida de las áreas de substancia blanca; presencia de conglomerados amorfos que corresponden a fragmentos de neurópila, también se pudo apreciar la presencia de algunos fragmentos de mielina, sin embargo ya no se observaron axones.

En comparación con los daños presentados en Leucoencefa- lomalacia y Edema cerebral, en la zona correspondiente al cerebro sano se observó continuidad y buena delimitación del contorno de los componentes de la mielina y el axón.

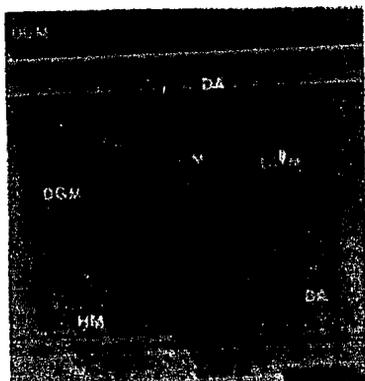


Figura 27. Edema cerebral: Hinchamiento de mielina con degeneración de axones y disociación de los grupos mielínicos con pérdida de la morfología de áreas de la sustancia blanca. 9500x

IM= Hinchamiento de mielina  
DA= Degeneración de axones  
DGM= Disociación de grupos mielínicos.

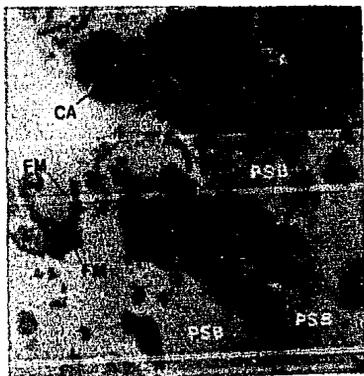


Figura 28. Leucoencefalomalacia: Pérdida de las áreas de la sustancia blanca, presencia de conglomerados amorfos y fragmentos de mielina. 9500x

PSB= Pérdida de sustancia blanca  
CA= Conglomerados amorfos  
FM= Fragmentos de mielina



Figura 29. Cerebro sano: Presencia de mielina y axones.

M= Mielina  
A= Axones

### Prueba biológica.

Las micotoxinas dosificadas a los caballos fueron las de Rf correspondiente a la Fusarenona X. La micotoxina de la muestra 2 (aislada de alimento contaminado que causó Leucoencefalomalacia) y la micotoxina de la muestra 4 (aislada de alimento contaminado que causó Edema cerebral).

A los asnos se les dio alimento contaminado que causó - Leucoencefalomalacia.

El caballo dosificado (durante 31 días) con la micotoxina aislada de alimento contaminado que causó Leucoencefalomalacia presentó los síntomas de somnolencia y ligera incoordinación alternando con días en que el animal se veía recuperado. El animal nunca se postró ni presentó otro tipo de síntomas (ver Figura 30).

El caballo dosificado (durante 29 días) con la micotoxina de alimento contaminado que causó Edema cerebral presentó los síntomas de pérdida de apetito, lagrimeo, incoordinación al caminar, somnolencia, depresión, cabeza en posición hacia abajo, apoyo de la cabeza contra la cerca y postración (ver Figura 31). En los últimos días del experimento el animal ya no podía levantarse, fue sacrificado y en la necropsia no se observaron daños en encéfalo ni en órganos viscerales.

En el estudio histopatológico se encontró Edema (ver Figura 32) distribuido perivasculare y en forma general en la sustancia blanca del cerebro, acompañado de hemorragias (ver Figura 33). La sustancia blanca presentó un aspecto esponjoso debido al Edema (ver Figura 32). También se apreció gran actividad de la astrogliá, microgliá y de la oli-

godendrogia (gliosis).

En hígado se observó moderada proliferación de conductos biliares e infiltración grasa en hepatocitos (hepatosis).

Los asnos alimentados (durante 30 días) con alimento procedente de un lugar donde se reportó un brote de leucoencefalomalacia, en general no presentaron síntomas de la enfermedad, a excepción de los primeros días donde se observó pérdida de apetito y somnolencia.

Los animales control no presentaron ningún cambio.

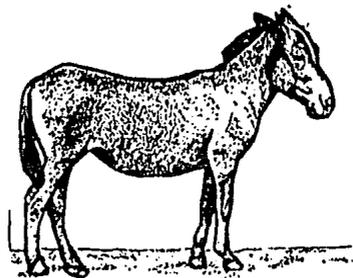
Los resultados obtenidos mostraron la presencia de los hongos Fusarium moniliforme y F. subglutinans en el alimento contaminado procedente de lugares donde se reportaron brotes de leucoencefalomalacia y edema cerebral equino, esto quedó demostrado en el análisis de micoflora donde estos dos hongos aparecieron en las muestras analizadas, con excepción de la muestra 1 que resultó negativa al análisis de micoflora, por lo que este alimento quedó considerado como no causante de los brotes de leucoencefalomalacia a pesar de haber sido muestreado en el lugar del brote de la enfermedad.

Estos dos hongos presentaron micotoxinas con el mismo Rf y espectrograma infrarrojo similar, sin embargo, en la prueba biológica encontramos diferentes resultados con cada una de las toxinas, mostrando que son diferentes.

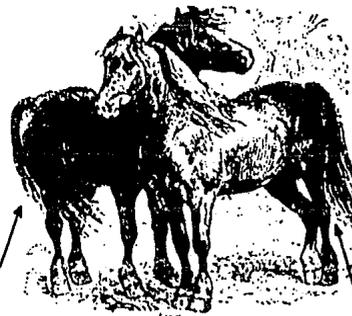
La dosificación realizada en la prueba biológica con la micotoxina aislada del alimento contaminado sospechoso de producir edema cerebral mostró que ésta es causante de la

enfermedad al haber reproducido los síntomas clínicos y -  
daños cerebrales de edema en el caballo. Sin embargo, la  
leucoencefalomalacia no se pudo reproducir después de la  
dosificación. Posiblemente la cantidad aplicada de micotox  
xina fue insuficiente para reproducir la leucoencefaloma-  
lacia ya que en los primeros días el caballo tratado pre-  
sentó síntomas de ésta, pero posteriormente se recuperó.

De igual forma la prueba realizada en asnos con alimen-  
to contaminado sospechoso de producir leucoencefalomalacia  
resultó negativa por tanto este alimento a pesar de proven  
nir de un lugar donde se presentó un brote de esta encefa  
lomatía no estuvo implicado como causante del brote.

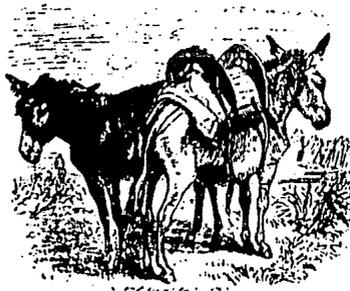


TESTIGO SANO

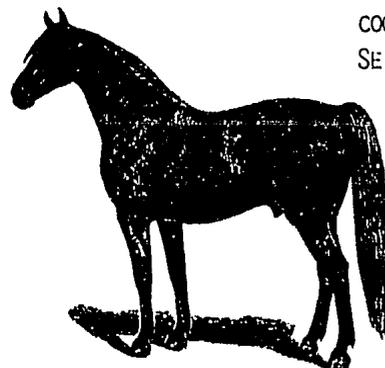


TESTIGO SANO

+ TOXINA (LEME) POR 31 DÍAS  
PRESENTÓ SOMNOLENCIA E IN-  
COORDINACION.  
SE RECUPERÓ.



+ ALIMENTO CONTAMINADO (LEME)  
POR 30 DÍAS.  
PRESENTARON ANOREXIA Y SOMNOLENCIA  
SE RECUPERARON.



+ TOXINA (EC), PRESENTÓ LAGRIMEO, INCORDINACIÓN, SOMNOLEN-  
CIA, DEPRESIÓN, APOYO DE LA CABEZA CONTRA LA CERCA (CEFALIA),  
POSTRACIÓN Y MUERTE.  
PRESENTÓ EDEMA CEREBRAL E HÍGADO FIBROSO Y GRASO.

Figura 30: Resultados de la Prueba Biológica.

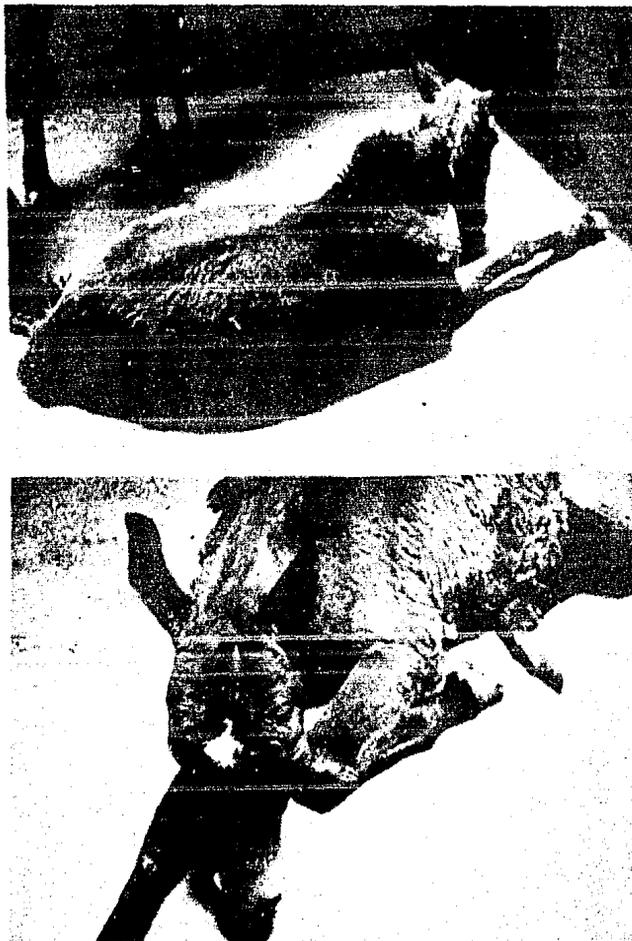


Figura 31: Caballo postrado después de dosificar con la micotoxina aislada de alimento contaminado que causó Edema cerebral. \*

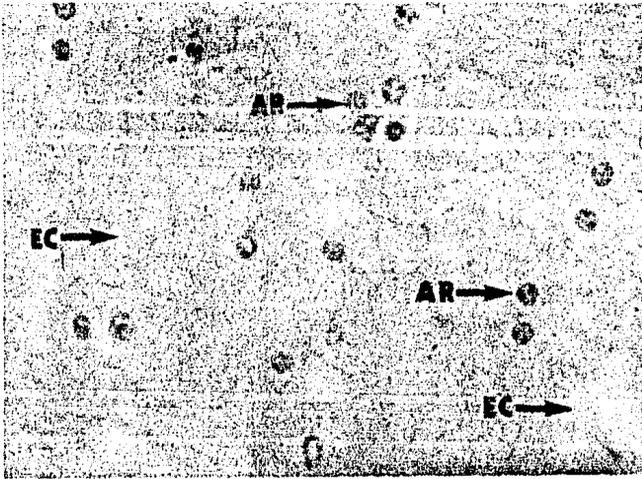


Figura 32: Infiltración de líquido intersticial (Edema) y presencia de astroglia reactiva (astrocitos). 400x \*

AR= Astroglia reactiva  
EC= Edema cerebral

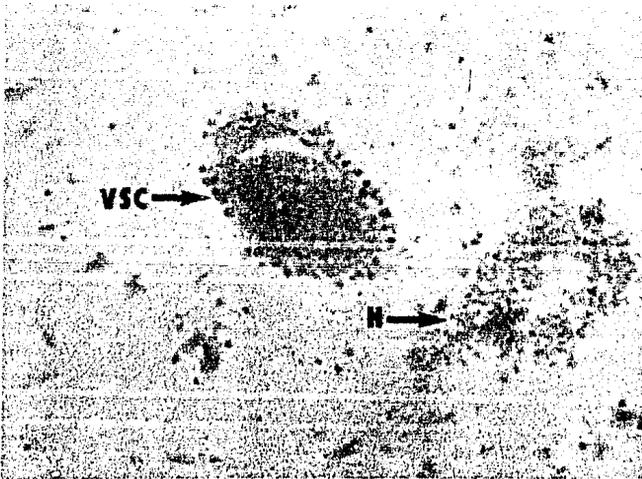


Figura 33: Vaso sanguíneo congestionado y zonas hemorrágicas. 400x \*

VSC= Vaso sanguíneo congestionado  
H= Hemorragias

\* Fotografías tomadas por la Dra. Reyna Sánchez San Martín del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## CONCLUSIONES

- 1.- En México existen reportes de brotes de encefalopatías de equinos atribuidos a virus como agente causal sin considerar que estos brotes pueden deberse al consumo de alimento contaminado con micotoxinas como lo demuestra este tra-  
bajo.
- 2.- Los métodos de Stoloff, et al. y Thomas, et al. utili-  
zados tradicionalmente para la extracción de aflatoxinas -  
también extraen micotoxinas del grupo de los tricotecenos.
- 3.- Fusarium moniliforme, Fusarium subglutinans y Fusarium  
anthophilum se encuentran en alimento contaminado sospecho  
so de producir leucoencefalomalacia equina.
- 4.- Fusarium moniliforme y Fusarium subglutinans están pre  
sentes en alimento contaminado procedente de lugares donde  
se reportaron brotes de edema cerebral equino.
- 5.- La micotoxina Fusarenona X y otras micotoxinas del gru  
po de los tricotecenos tipo B están presentes en alimento  
contaminado procedente de lugares donde se reportaron bro  
tes de leucoencefalomalacia y edema cerebral equino.

6.- Los estudios realizados demuestran que la micotoxina - moniliformina, la cual a sido mencionada como posible causa de la leucoencefalomalacia y el edema cerebral, no está implicada en estas enfermedades.

7.- La micotoxina identificada como Fusarenona X es responsable del Edema cerebral equino, ya que se reprodujo la enfermedad en la prueba biológica al dosificar con esta micotoxina.

8.- La micotoxina encontrada en el alimento contaminado - sospechoso de producir leucoencefalomalacia equina no es responsable de esta encefalopatía, ya que no reprodujo la enfermedad en la prueba biológica.

## LITERATURA CITADA

- Abbas, H.K., Shier, W.T. and Mirocha, C.J. 1984. Sensitivity of Cultured Human and Mouse Fibroblasts to trichothenes. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 607-610.
- Badiali, L., Abou-Youssef, M.H., Radwan, A.I., Handy, F.M. and Hildebrandt, P.K. 1968. Moldy corn poisoning as the mayor cause of an encephalomalacia syndrome in Egyptian Equidae. Am. J. Vet. Res. 29: 2029-2035.
- Biester, H.E., Schwarte, L.H. and Reddy, C.H. 1940. Further studies on moldy corn poisoning (Leukoencephalomalacia) in horses. Vet. Med. 35: 636-639.
- Buckley, S.S. and MacCallum, W.G. 1901. Acute hemorrhagic encephalitis prevalent among horses in Maryland. Amer. Vet. Rev. XXV: 99-102.
- Butler, T. 1902. Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive results. Amer. Vet. Rev. XXVI: 748-751.
- Campos, L. 1987. "Estudio comparativo de tres métodos de extracción de zearalenona, micotoxina producida por Fusarium spp. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, D.F. 57 pp.
- Collins, G.J. and Rosen, J.D. 1979. Gas-Liquid Chromatographic/Mass Spectrometric Screening Method for T-2 Toxin in Milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 62: 1274-1280.
- Conley, R.T. 1979. Espectroscopía Infrarroja. Ed. Alhambra. España. 346 pp.
- Correa, F.R., Meirelles, M.A., Soares, J.M., Machado, J.J. and Zambrano, A.F. 1982. Equine leucoencephalomalacia associated with ingestion of moldy corn in three counties in southern Brazil. Pesq. Vet. Bras. 2 (1): 27-30.
- De León, C. 1984. Enfermedades del Maíz. Una Guía para su Identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT). 3a. Edición. 114 pp.

Domenech, J., Boccas, B., Pellegrin, F., Laurent, D., Kohler, F., Magnol, J. and Lambert, C. 1985. Equine leucoencephalomalacia in New Caledonia. Australian Veterinary Journal 62 (12): 422-423.

Ensminger, M.E. 1973. Producción Equina. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. 397 pp.

Eppley, R.M. 1979. Trichothecenes and their Analysis. Journal of American Oil Chemists Society 56: 824-829.

Eugenio, C.P., Christensen, C.M. and Mirocha, C.J. 1970. Factors Affecting Production of the Mycotoxin F-2 by Fusarium roseum. Phytopathology 60: 1055-1057.

Fisher, N.L., Marasas, W.F.O. and Toussoun, T.A. 1983. Taxonomic importance of microconidial chains in Fusarium section Liseola and effects of water potential on their formation. Mycologia. 75 (4): 693-698.

Graham, R. 1935. Results of inoculating laboratory animals with equine brain-tissue suspensions and equine brain-tissue filtrates from spontaneous cases of so-called cornstalk disease. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 86: 778-780

Kamimura, H., Nishijima, M., Yasuda, K., Saito, K., Ibe, A., Nagayama, T., Ushiyama, H. and Naoi, Y. 1981. Simultaneous Detection of Several Fusarium Mycotoxins in Cereals, Grains, and Foodstuffs. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64: 1067-1073.

Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Piemnar, J.G. and Naude, T.W. 1972. A mycotoxicosis of equidae caused by Fusarium moniliforme Sheldon. Onderstepoort J. Vet. Res. 39: 205-208

Kriek, N.P.J., Kellerman, T.S. and Marasas, W.F.O. 1981. A comparative study of the toxicity of Fusarium verticillioides (=F. moniliforme) to horses, primates, pigs, sheep and rats. Onderstepoort J. Vet. Res. 48: 129-131.

Manns, T.F. 1923. Parasitic fungi internal of seed corn. J. Agric. Res. 23: 495-524.

- Marasas, W.F.O., Kellerman, T.S., Pienaar, P.G. and Naude, T.W. 1976. Leukoencephalomalacia: A mycotoxicosis of equidae caused by Fusarium moniliforme Sheldon. Onderstepoort J. Vet. Res. 43: 113-122.
- Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. 1984. Toxigenic Fusarium species. Identity and Mycotoxicology. The Pennsylvania State University Press. U.S.A. 328 pp.
- Marasas, W.F.O., Wehnwr, S.J., Van Rensburg, S.J. and Van Schalkwyk, D.J. 1981. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, Southern Africa. Phytopathology 71: 792-796.
- Marshall, E. 1984. Yellow Rain Exports Battle Over Corn Mold. Science 221: 526-529.
- Medina, C.D.M. y Zenteno, Z.M. 1976. Micoflora de mazorca del maíz en México. II. Bol. Soc. Mex. Mic. 10: 71-77.
- Mirocha, C.J. and Christensen C.M. 1983. Mycotoxins. Chapter 8. Store of Cereal Grains and their Products. Academic Press. U.S.A. 241-280.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. Fusarium species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. U.S.A. 193 pp.
- Nelson, R.R. and Osborne, J.C. 1956. The relative prevalence and geographic distribution of fungi associated with moldy corn in eastern North Carolina in 1955. Pl. Dis. Repr. 40: 225-227.
- Pathre, S.V. and Mirocha, C.J. 1977. Mycotoxins in Human and Animal Health. Pathotox Publishers, Park Forest South, ILL, U.S.A. 229-253.
- Pereda, P. 1987. "Estudio analítico de tres técnicas de recuperación de aflatoxina B<sub>1</sub>". Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México, D.F. 91 pp.
- Pereda, P., Carvajal, M. y Campos, L. 1988. Estudio analítico de tres técnicas de purificación en Aflatoxina B<sub>1</sub>. Rev. Lat-amer. Microbiol. (en prensa)

Purchase, I.F.H. 1974. Mycotoxins. Elsevier scientific publishing company. The Netherlands. 385 pp.

Romer, T.R. 1986. Use of Small Charcoal/Alumina Cleanup Columns in Determination of Trichothecene Mycotoxins in Foods and Feed. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 699-703.

Sánchez, S.M.R., De Alba G.P. y Constantino C.F. 1987. Leucoencefalomalacia en equinos (Estudio anatomopatológico de tres casos). Veterinaria, México, 18 (2): 145-150.

Schwarte, L.H., Biester, H.E. and Murray, C. 1937. A disease of horses caused by feeding moldy corn. J. Am. Vet. Med. Assoc. 90: 76-85

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1986. Boletín de la Comisión México-Americana para la prevención de la fiebre aftosa. Dirección General de Sanidad y Protección Agropecuaria y Forestal, Investigación de un posible brote de E.E.V. (México, D.F.: No.22 Agosto 1986). pp.3

Stoloff, L., Nesheim, S., Yin, L., Rodricks, J.V., Stack, M. and Campbell, A.D. 1971. Multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54: 91-97.

Thiel, P.G., Meyer, C.J. and Marasas, W.F.O. 1982. Natural Occurrence of Moniliformin together with Deoxynivalenol and Zearalenone in Transkeian corn. J. Agric. Food Chem. 30: 308-312.

Thomas, F., Eppley, R.M. and Trucksess, M.W. 1975. Rapid screening method for aflatoxins and zearalenone in corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 58 (1): 114-116.

Tsung-Che, T. and Li-lin, L. 1986. Mycotoxins produced by Fusarium spp. of Taiwan. Bot. Bull. Academia Sinica 27: 35-43.

Tuite, J. 1961. Fungi isolated from unstored corn seed in Indiana in 1956-1958. Pl. Dis. Repr. 45: 212-215.

Ulloa, M. y Hanlin, R. 1978. Atlas de Micología Básica. Ed. Concepto. México. 158 pp.

Van Der Walt, S.J. and Steyn, D.G. 1943. Recent investigations into the toxicity of plants, etc. XIII. Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind. 18: 207-224.

Vieyra Callejas, J. 1985. "Contribución al estudio de la Encefalitis Equina Venezolana en México 1979-1984". Tesis de Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M., México, D.F. 47 pp.

Visconti, A., Bottalico, A., Palmisano, F. and Zambonin, P. G. 1984. Differential-Pulse Polarography of Trichothecene Mycotoxins. Determination of Deoxynivalenol, Nivalenol, and Fusarenone-X in Maize. Analytica Chimica Acta. 159: 111-118

Wilson, B.J. and Maronpot, R.R. 1971. Causative fungus agent of leucoencephalomalacia in equine animals. Vet. Rec. 88: 484-486.

Wilson, B.J., Maronpot, R.R. and Hildebrandt, P.K. 1973. Equine leucoencephalomalacia. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 163: 1293-1294.

Young, J.Z. 1985. La vida de los vertebrados. Ed. Omega. España. 565 pp.