

870106

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE BIOLOGIA

1
2ej



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**" EFECTOS TERATOGENOS Y CANCERIGENOS DE
MICOTOXINAS B-1 Y ZEARALENONA EN RATONES "**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

CARLOS MANUEL MATEOS VIZARRA

GUADALAJARA, JAL.

1992



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.

INDICE.

	Páginas
Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	iii
Indice.....	iv
Lista de figuras.....	vii
Lista de Tablas.....	x
RESUMEN.....	xi
SYNTHESIS.....	xiii
INTRODUCCION.....	1
Objetivos.....	1
Antecedentes.....	2
Características de las micotoxinas.....	9
Características de las aflatoxinas.....	11
Aspectos generales de las micotoxinas.....	17
Efectos de las micotoxinas.....	18
a) Micotoxina (Zearalenona).....	18
b) Aflatoxina (B-1).....	19
Características de los hongos empleados.....	20
a) <u>Aspergillus flavus</u> Link.....	20
b) <u>Fusarium moniliforme</u> Sheldon.....	21
Taxonomía.....	22
MATERIALES Y METODOS.....	24
1.- Medios de cultivo.....	25

a) Medio de de Papa-Dextrosa-Agar.....	25
b) Medio de Malta-Sal-Agar.....	26
2.- Aislamiento de micoflora.....	27
3.- Multiplicación del inóculo.....	29
a) Reproducción de los hongos en maíz y arroz.....	30
b) Metodo de preparación de los alimentos.....	32
4.- Determinación del hongo.....	33
a) Estudio de microscopia óptica.....	34
5.- Preparación de los estándares.....	35
6.- Técnica histológica.....	36
a) Fijación.....	36
b) Deshidratación.....	37
c) Inclusión.....	38
d) Microtomía.....	39
e) Coloración.....	40
f) Microscopia óptica.....	42
RESULTADOS.....	43
Determinación de efectos del tratamiento en los ratones....	43
a) Alimento testigo.....	43
b) Alimento con <u>Fusarium moniliforme</u> Sheldon.....	43
c) Alimento con <u>Aspergillus flavus</u> Link.....	44
d) Alimento con aflatoxina B-1.....	44

	Páginas
e) Alimento con micotoxina Zearalenona.....	44
Daños en los órganos de los ratones.....	55
a) Jaula # 1. (testigo).....	55
b) Jaula # 2. (con <u>Aspergillus flavus</u> Link).....	55
c) Jaula # 3. (con <u>Fusarium moniliforme</u> Sheldon).....	55
d) Jaula # 4. (con aflatoxina B-1).....	56
e) Jaula # 5. (con micotoxina Zearalenona).....	56
Análisis estadístico de los resultados.....	60
a) Hembras.....	60
b) Machos.....	61
DISCUSION.....	70
CONCLUSIONES.....	73
BIBLIOGRAFIA.....	75

LISTA DE FIGURAS.

	Páginas
Figura 1.- <u>Aspergillus flavus</u> L. A, Tipo de arreglo; B, C, conidioforos con cabezas conidiales...	23
Figura 2.- <u>Fusarium moniliforme</u> S. A, hifa con conidioforos simples; B, otro tipo de conidioforos; C, un esporodioo suelto formado por ramificaciones de conidioforos; D, conidias.....	23
Figura 3.-Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie <u>Mus musculus</u> L. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.....	46
Figura 4.-Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie <u>Mus musculus</u> L. alimentados con <u>Fusarium moniliforme</u> S. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.....	48
Figura 5.-Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie <u>Mus musculus</u> L., alimentados con <u>Aspergillus flavus</u> L. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.....	50
Figura 6.-Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie <u>Mus musculus</u> L., alimentados con aflatoxina B-1. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.....	52
Figura 7.-Resultado de las medias del peso por sexo cada tercer día, de los ratones de la especie <u>Mus musculus</u> L., alimentados con una mezcla de micotoxina Zearalenona y alimento para ratones. El promedio se obtuvo sacando la media del peso cada tercer día.....	54

- Figura 8.-Se muestra una de las jaulas empleadas en el experimento. En este caso son ratones machos marcados con ácido Pícrico.....57
- Figura 9.-Los órganos son de hembras, del lado izquierdo son del grupo testigo y los de la derecha son del grupo tratado con Zearalenona. Se aprecia una diferencia entre los estómagos (en medio) y los órganos genitales (abajo).....57
- Figura 10.-Los órganos del lado izquierdo pertenecen a un ratón macho del grupo testigo y los de la derecha a un ratón macho del grupo tratado con Aspergillus flavus L. Observese el tamaño de los testículos (abajo) y el tamaño y decoloración del hígado (arriba) del lado derecho.....58
- Figura 11.-Los órganos del lado izquierdo son de ratón macho del grupo testigo y los de la derecha de ratón macho del grupo alimentado con el hongo Fusarium moniliforme S. Observese la decoloración tamaño del hígado (arriba) y el tamaño del estómago (en medio) del lado derecho58
- Figura 12.-Los órganos son de machos, del lado derecho son del grupo testigo y los de la izquierda del grupo alimentado con aflatoxina B-1. Se aprecian diferencias de tamaño y color entre los estómagos (abajo) y los hígados (arriba).....59
- Figura 13.-En esta gráfica observamos los cambios en los resultados obtenidos del análisis estadístico por covarianza con la prueba de comparaciones múltiples y los parámetros en que se encuentran los valores del peso de hembras y machos de Mus musculus L.....64
- Figura 14.-Fotomicrografía de un corte de hígado normal en el que observamos la Vena Central (CV), Sinusoides (Pr), Tejido Conectivo Interlobular. 400x.....65

- Figura 15.-En esta microfotografía de hígado normal se observan, la Vena Porta(PV), la Arteria Hepática (HA), el Conducto Biliar (BD), Tejido Conectivo (CT) y la Células de Kepffer (en). 400x.....65
- Figura 16.-Se observa un decoloramiento que denota un necrosamiento en las células y una pérdida del tejido conectivo. En un hígado de ratón macho tratado con Aspergillus flavus L. 400x.....66
- Figura 17.-Se observa un deterioro en la continuidad de las células hepáticas y en los sinusoides. En hígado de ratón hembra tratado con Aspergillus flavus L. 400x...
.....66
- Figura 18.-Se observa un acumulación muy notable en las células que forman las láminas hepáticas y la pérdida de continuidad del endotelio que rodea a los sinusoides. En hígado de ratón hembra tratado con Fusarium moniliforme S. 400x.....67
- Figura 19.-Se observa un necrosamiento en las células y posible carcinoma hepático. En hígado de ratón macho tratado con Fusarium moniliforme S. 400x.....67
- Figura 20.-Se observa una acumulación de células y posible carcinoma hepático aunado con deterioro en el tejido conectivo que rodea a la Vena Central. En ratón macho tratado con aflatoxina B-1. 400x.....68
- Figura 21.-Se observa una pérdida en el tejido conectivo que rodea a la Vena Central. En ratón macho tratado con aflatoxina B-1. 400x.....68
- Figura 22.-Se observa necrosidad de las células y posible presencia de carcinoma hepático, alteración tanto en los sinusoides que en algunas partes se encuentran muy reducidos y en otras muy grandes. En ratón macho tratado con micotoxina Zearalenona. 400x.....69

LISTA DE TABLAS.

Tabla # 1.	Nos muestra el número de hongos probados en la Universidad de Minnesota y el número de hongos letales a ratas, 1965-1967.....	16
Tabla # 2.	Comparación del peso en ratones hembras y machos, obtenidos en el alimento testigo. Control de peso cada tercer día. Todos los pesos en gramos.....	45
Tabla # 3.	Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en el alimento con <u>Fusarium moniliforme</u> S. Control de peso cada tercer día. Todos los pesos en gramos. Los datos subrayados son de los ratones más afectados.....	47
Tabla # 4.	Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en el alimento con <u>Aspergillus flavus</u> L. Control de peso cada tercer día. Todos los pesos en gramos. Los datos subrayados son de los ratones más afectados.....	49
Tabla # 5.	Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en el alimento con aflatoxina B-1. Control de peso cada tercer día. Los datos subrayados son de los ratones más afectados.....	51
Tabla # 6.	Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en la mezcla de alimento con micotoxina Zearaleona. Control de peso cada tercer día. Los datos subrayados son de los ratones más afectados.....	53
Tabla # 7.	Comparación de los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los diferentes alimentos.....	63

El problema que resulta del consumo de alimentos contaminados por hongos ya sean Aspergillus sp. Link, o Fusarium sp. Link, es más común de lo que parece ya que las toxinas producidas por estos, no importa de que tipo sean, llamense aflatoxinas o micotoxinas, son capaces de alterar debido a su composición química el metabolismo e incluso pueden causar la muerte a quien las consume. Producir lesiones cancerígenas o teratógenas a nivel de hígado, riñón, cerebro, corazón y órganos genitales como las reportadas por Akao et al (1979) y Butler (1964). Este problema es debido principalmente al mal manejo y almacenamiento de granos en muchos países (Christensen, 1975, 1976) e indiscutiblemente a la falta de información del problema, ya sea por falta de recursos económicos o negligencia en las autoridades a las que les corresponde controlar e informar de este, ya que no es del dominio público.

En este trabajo se utilizaron dos medios de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Papa-Maltosa-Sal (PMS) para inducir al crecimiento y esporulación de los hongos como lo describe Koneman et al. (1987), en las especies Aspergillus flavus Link. y Fusarium moliniforme Sheldon. que son escogidas por ser las más conocidas por sus daños a nivel de órganos y su toxicidad.

Se utilizaron estándares de Zearalenona y de B-1. Una vez obtenidos los hongos, se procedió a mezclar cada especie de hongo y cada estandar por separado con alimento para ratón. Se emplearon ratones de la especie Mus musculus L., y se les dio de comer el alimento mezclado.

Se hizo un análisis de las toxicidades causadas por el alimento despues de darselos de comer por algun tiempo a los ratones, tanto por los hongos como por los estandares de toxinas, para determinar sus efectos. Se determino que ambos especies de hongos y ambos estandares producen alteraciones bastante graves a los órganos de los ratones, que van desde disminución en el peso corporal, necrosis en el hígado hasta ocasionarles la muerte como lo describe Wyllie et al. (1977).

The resulting problem from the consumption of fungi-contaminated food, either Aspergillus sp. Link, or Fusarium sp. Link, is more common than what it looks. Toxins produced by these fungi -no matter what kind, whether aflatoxins or mycotoxins- are capable of altering the metabolism due to their chemical composition; they may even cause death to whomever consumes them; they may produce cancerus or teratogenus lesions in the liver, kidney, brain, heart and genital organs as the reported by Akao et al. (1979) and Butler (1964). This problem is mainly caused by the inadequate management and storage of grains (Christensen, 1975, 1976) and the lack of information about the problem, either because of a lack of economic resources or because of carelessness on the authorities' part. particularly those responsible of contolling and providing information about this, which is not part of the general public knowledge.

In this research two cultivation media were used, Potatoe-Dextrose-Agar (PDA) and Maltose-Salt-Agar (MSA) to induce growth and sporation as the describe by Koneman et al. (1987) in the Aspergillus flavus Link. and Fusarium moliniforme Sheldon. fungi, which were chosen because they are known to cause more lesions in the organs and because of their toxicity.

Zearalenone and B-1 standards were used. Once the fungi were obtained, each species was separately mixed with each standard and mouse food.

Mus musculus L. mice were used in the research; they were fed with the mixture.

An analysis was made about the toxicities produced by the food after the mice ate it for some time, both fungi-related toxicity and standard-related toxicity, in order to determine the effects.

It was determined that both species of fungi and both standards produce serious disorders in the mice's organs, which range from decrease of body weight, liver necrosis up to death as described by Wyllie et al. (1977).

INTRODUCCION.

Los hongos son de gran importancia en el mundo debido a su enorme capacidad de adaptación en todos los medios; su amplia distribución y sobre todo por los grandes problemas de contaminación que producen tanto en cosechas como en el alimento ya almacenado.

Además de los problemas de contaminación por hongos, que propician la descomposición de los alimentos, encontramos otro factor importante como lo es la producción de micotoxinas, en especial nos referimos a las aflatoxinas, que son metabolitos secundarios producidos por los hongos cuando su crecimiento se encuentra restringido ya sea por factores de la misma colonia o por factores como la temperatura, humedad y el tipo de sustrato en donde se desarrolla la colonia. Se sabe que estas aflatoxinas además de ser agentes cancerígenos, tienen una gran toxicidad y que incluso pueden llevar a la muerte.

Objetivos.

Los objetivos a desarrollar en el presente trabajo son:

- 1.- Determinar los efectos tanto a nivel histológico y morfológico en hígado, estómago y órganos genitales de ratones, producidos por micotoxinas

B-1 y Zearalenona, tomando en cuenta el factor tiempo.

- 2.- Comparar los efectos de malformaciones celulares y teratógenos de los estándares de micotoxinas B-1 y Zearalenona, con las cepas puras de hongos productores, en hígado y estómago de roedores.

Antecedentes.

En los años de 1893 y 1914 aparecen brotes de una enfermedad mortal de los caballos, Graham (1935), publica un artículo en el que se describe este brote, el cual se sospecha tiene origen en el consumo de alimentos ahongados, pero no se logra identificar la causa que origina la enfermedad.

Una asociación de sustancias tóxicas con plantas y productos de plantas usadas para el consumo animal o humano ha sido hecha desde entonces a la fecha, esta asociación actualmente tiene más validez. Ya que a partir del año de 1901, Buckley y MacCallyum et al. (1901), reportan datos de su investigación acerca de la relación de los hongos con el hombre, cuando reportan un envenenamiento de caballos por Fusarium sp. Link. y Butler (1902), reporta la muerte de caballos por consumo de maíz mohoso.

Graham (1935), reporta que en el año de 1934 en el estado de Illinois, en la parte central del estado mueren

5000 caballos a lo que llama enfermedad del "maíz mohoso". Kellerman et al. (1936), reporta que el hongo Fusarium sp. Link., es el causante de la toxicidad y perturbaciones digestivas en cerdos.

Willey et al. (1977), reporta que en el año de 1940 el maíz enmohecido causa envenenamiento en caballos y que en 1943-44 propicia una aleukia alimentaria tóxica causada por el consumo de Fusarium sp. Link., contenido en cereales contaminados en U.R.S.S.

En el año de 1952 Burnside et al. (1970), reporta una enfermedad en la cual se envenenaron 1000 marranos en la región suboccidental de los Estados Unidos y en 1953 el envenenamiento de 533 marranos con una mortandad del 22 por ciento, señalándose que es a causa del maíz contaminado con hongos y que además solo un pequeño grupo de animales es llevado a análisis al laboratorio, lo que no representa gran relevancia para el estudio de las toxinas.

En 1954 se reporta una producción de síntomas clínicos y patológicos de una enfermedad desconocida en cabras, esto asociado con el hongo Aspergillus sp. Link., según reporta Newberne et al. (1971).

A mediados y finales de los cincuentas los investigadores Chanh et al. (1979), Christensen (1976), Hamilton (1971) y Hesseltine (1979), reportan enfermedades en cabras y cerdos causadas por el consumo de maíz mohoso. En el año de 1960 en Inglaterra, Butler (1964), reporta una

enfermedad en los pavos e incrimina a las toxinas producidas por los hongos, las cuales causan la muerte de 100,000 pavos y sospecha que un virus es la causa, pero su investigación descarta esa idea, ya que encuentra que el factor común de la enfermedad es un lote de alimento producido por la Oil Cake Mills, Ltd. y esta compañía tiene que explicar las pérdidas a sus clientes, lo que estimula la investigación sobre el problema y para 1962 la causa es situada en un lote de cacahuate procedente del Brasil, el cual ha sido invadido por el hongo Aspergillus flavus Link. Tuvo suerte ya que encuentra muestras de cacahuates después de dos años de manufactura del alimento y además el A. flavus Link. aún estaba presente, es detectado y no estaba enmascarado por otros hongos. El investigador gracias a esto, encuentra que una toxina producida por A. flavus Link. es la responsable de la muerte de los pavos.

En el trabajo con micotoxinas por parte de investigadores de la Universidad de Minnesota, citados por Christensen (1975), en los años de 1965-1967 en el que se prueban 196 aislamientos de Aspergillus sp. Link., aparte de A. flavus Link. y A. ochraceus Link. para su toxicidad en ratas, pollos y patos, los cuales dan como resultado que ochenta y cinco de la población o sea el 45 por ciento mueran en menos de siete días, aún cuando se cultivaron en maíz húmedo y esterilizado en autoclave ya que algunas de estas

especies de hongos son comunes en ciertos lotes de algunas clases de alimento para animales.

Burnside et al. (1970), del mismo grupo de investigadores, publica los resultados de la investigación que realiza en el año de 1967 con grano ahogado que se sospecha tóxico; de tales cepas nueve fueron de Aspergillus flavus Link. y una de Penicillium rubrum Stoll. Todas las cepas son cultivadas por separado en maíz húmedo esterilizado en autoclave, el cual es dado a los cerdos. Estos murieron en unos cuantos días mostrando síntomas externos e internos similares a los que mostraron los animales que originalmente presentaron la enfermedad.

Deacon (1980) y Mirocha et al. (1983), reportan que en las regiones de Africa, India y Asia Sudoriental, el consumo de alimentos contaminados por hongos produce daños severos al hígado y es común entre los pobladores de dichas regiones que lo padezcan. También en los países desarrollados existen estos problemas, considerando que en todo lugar se consumen alimentos invadidos por hongos que bajo condiciones adecuadas tienen toxinas, las cuales son producidas por muchos de los hongos potencialmente peligrosos y que no han podido ser aisladas e identificadas, por lo tanto no hay forma de detectarlas en los alimentos.

El énfasis sobre el incremento en la producción de granos en los países sobrepoblados y desnutridos del mundo, está llevando a que la calidad de estos no sea tan buena, ya

que las técnicas de almacenaje no son las adecuadas aunque probablemente es mejor comer alimentos contaminados que no tener nada que comer; por esto los programas sobre la producción de alimentos deben de tener como prioridad el mejorar tanto la calidad, la cantidad y el almacenamiento de los alimentos, ya que la mayoría de las micotoxinas producidas por los hongos crecen sobre los productos después de la cosecha, así lo explica Christensen (1976).

Sin embargo, para que la toxina esté presente no es necesario que el producto se encuentre severamente invadido por el hongo. Brook y White et al. (1962), citados por Christensen (1976), señalan que si del 3 al 5 por ciento de las semillas de un determinado lote están invadidas por hongos, el alimento fabricado con tales semillas puede ser tóxico. M. Taber y Schroeder et al. (1974), citados por Christensen (1976), en Texas, hacen crecer el arroz y un cacahuete húmedo estéril y se aíslan de ambos 213 cepas de A. flavus Link., todas las cepas producen en ambos substratos, algo de aflatoxina B-1 la más tóxica de las aflatoxinas que se conocen. Esto es suficiente para que cualquier persona dude acerca de la sanidad de casi cualquier producto en el que el hongo puede crecer.

Christensen (1979) y Juungerman (1977), reportan que los animales tienen diferentes grados de resistencia a las aflatoxinas y de los más sensibles se encuentran los patos y las truchas, ya que al consumir alimentos con pocas partes

por millón¹ (mg/kg), de aflatoxinas por unos cuantos días o semanas, puede ser fatal o producirles cáncer.

Butler (1964), considera a la aflatoxina B-1 como uno de los más potentes venenos de la célula de que se tenga conocimiento y es altamente cancerígena. Aún no se conoce la sensibilidad en el hombre, pero los monos rhesus son moderadamente sensibles a las aflatoxinas aún cuando estas pueden ser detectadas e identificadas por medios químicos, no sabemos si el consumo de cantidades demasiado pequeñas en un período de treinta o cuarenta años puede causar daño.

Cuando las aflatoxinas son detectadas en Estados Unidos, Mirocha et al. (1982) y Pathre et al. (1977), empiezan a investigar el problema y a encontrar la forma de reducir o eliminar la aflatoxina en las cosechas. Pronto descubren que el hongo A. flavus Link. invade al cacahuate después de que las plantas son sacadas del suelo y antes de que se cosechen las vainas. Y concluyen en que el secado rápido después de que las plantas son arrancadas reduce grandemente la infección.

Mediante el análisis del cacahuate y sus productos para determinar la presencia de la aflatoxina prácticamente se elimina la posibilidad de encontrar en el comercio estos productos con aflatoxinas.

Si bien la investigación de las aflatoxinas producidas por hongos, han tenido mayor énfasis y este esfuerzo continua, la atención también se ha vuelto a otras toxinas

concernientes a su relación causa-efecto con enfermedades conocidas o su posible implicación en un número de enfermedades idiopáticas. Por lo tanto la preocupación por la aflatoxina y aflatoxicosis se ha convertido en una extensión de micotoxina y micotoxicosis.

Una amplia variedad de hongos y metabolitos de hongos se revisan con interés, los descubrimientos de los años recientes tienen implicaciones que incluyen no solo a la calidad de los alimentos tanto de origen animal como los de origen vegetal, sino también la disponibilidad de productos limpios de toxinas. Se discuten aspectos relacionados con el control de alimentos y forrajes alimenticios para evitar su consumo, ya que como se ha dicho antes, algunas micotoxinas son cancerígenas y por lo tanto la salud humana se ve directamente amenazada.

Por consiguiente las naciones en proceso de emerger y las subdesarrolladas del mundo están posiblemente más preocupadas por la simple disponibilidad de alimentos de cualquier calidad, ya que no cuentan con la infraestructura para el control de éstas.

En los E.U.A. la preocupación de una pérdida de calidad en los alimentos, se refleja en el control que existe en éstos, tanto en los de origen doméstico como en los importados. Al desarrollo de métodos analíticos de detección más exactos y a la determinación de límites legales para micotoxinas en alimentos y forrajes.

Características de las micotoxinas.

En el estudio de los hongos encontramos a Fusarium sp. Link., como uno de los más dañinos, ya que el maíz almacenado en mazorca es invadido en los graneros. De los 75 aislamientos que se prueban en un experimento descrito por Burnside et al. (1970), en el que se utilizan lotes de maíz almacenado que se encuentran infectados por Fusarium sp. Link., 35 de los cuales al ser dado como alimento a ratas les producen un incremento en el peso del útero en un período de cuatro a siete días. Algunos de estos aislamientos cultivados en maíz húmedo, esterilizado en autoclave y usado para alimentar a ratas les causa la muerte en cuatro a cinco días con incrementos de hasta diez veces el peso del útero. La substancia estrogénica producida por Fusarium sp. Link., es extraída e identificada como un compuesto fenólico el cual es idéntico a la substancia implicada en una enfermedad similar en cerdos de Indiana, produciéndoles abortos a las marranas. El compuesto no pudo ser aislado del alimento y aún cuando el hongo ha muerto, la toxina permanece. Los abortos en las marranas son atribuidos a Fusarium sp. Link., gracias a la prueba realizada con marranas alimentadas con maíz invadido con este hongo.

El compuesto estrogénico producido por Fusarium sp. Link., se le denomina F-2, el cual se cree que es más potente por vía bucal que inyectado. Algunos investigadores como Goldblaft (1972), afirman que el maíz invadido por Fusarium sp. Link., lo suficiente para ser tóxico, será rechazado por los cerdos que morirán de hambre antes de consumir el grano.

Bottalico et al. (1980) y Caldwell et al. (1970), describen a la Zearalenona (Z) como una micotoxina estrogénica producida por Fusarium sp. Link., que afecta en mayor o menor grado y en formas diversas a numerosas especies animales de gran valor económicos principalmente a las hembras. Es una sustancia no esteroidea que ejerce una acción sobre los aparatos reproductores de los animales que la ingieren, las principales lesiones descritas por Christensen et al. (1967), son: vulvovaginitis, prolapsos vaginales, úteros agrandados y edematosos, atrofia de ovarios, disminución de la fertilidad en las hembras y en los machos el atrofiamiento de los testículos. La toxina es producida por la contaminación de granos con diversas especies de Fusarium sp. Link.: F. moniliforme Link., F. oxysporum Klotz., F. roseum Link. y F. tricinctum Snyder & Hansen.

Algunos de los países que son afectados por este hongo son Canadá, Estados Unidos, Sudáfrica y Argentina. Para su control se toman algunas muestras en los alimentos en los que puede encontrarse la toxina y se analizan inmediatamente con el fin de evitar la contaminación durante el almacenamiento.

lo que da como resultado que los niveles de contaminación sean moderados y por consiguiente no representen un peligro para la salud animal.

Mirocha et al. (1983), afirma que la producción de Zearalenona no depende sólo de la presencia de cepas toxigénicas de Fusarium sp. Link., cuya capacidad de producción puede variar desde nula a elevada, sino también de la existencia de condiciones ambientales favorables en particular, de temperatura y humedad ideales. Y por esto, cuando no se conocen las condiciones en las que crece la cepa, no se puede afirmar si ésta llega a producir toxinas en condiciones naturales.

Características de las aflatoxinas.

En términos generales hay una gran cantidad de procesos metabólicos que tienen poco en común, a excepción de los que son más activos cuando el crecimiento normal es restringido.

Más de 1000 metabolitos secundarios de origen hongal son caracterizados químicamente; estos difieren grandemente en composición química y en las diferentes especies. Sin embargo, se conocen muy pocos que tengan roles específicos en la vida de los organismos que los producen.

Algunos metabolitos tienen un gran valor comercial; los antibióticos, las hormonas como las giberelinas y muchos

componentes de harinas de alimentos son solo algunos de los ejemplos. Pero otros son extremadamente tóxicos al hombre, como las aflatoxinas que son la contaminación más común en los granos para el consumo humano y animal.

Para Burnett (1976) y Wyllie et al. (1977), hay tres características principales de los metabolitos secundarios:

- 1.- Su producción es extremadamente específica, confinada solo a una especie o a un grupo de especies.
- 2.- En general no tienen función obvia en la vida del organismo productor.
- 3.- Son producidos por células que crecen restringidas. Esto sucede en fases estacionarias en cultivos, durante el crecimiento exponencial en cultivos continuos provistos de rangos de crecimiento específico menores de una micra.

En todo esto difieren de los metabolitos primarios, ya que estos se forman en el crecimiento normal. La hifa solo crece en los ápices y estas células se localizan hacia atrás en el micelio.

Las aflatoxinas son complejas y los mecanismos de su biosíntesis son desconocidos, solo se sabe que el malonil CoA es su precursor. Pequeñas diferencias en la estructura de éstas, pueden dar mayor diferencias en sus toxicidades: las aflatoxinas B-1 y G-1 son altamente tóxicas, B-2 y G-2 son menos tóxicas, las aflatoxinas M-1 y M-2 son productos

hidroxilados de B-1 y B-2. Es interesante hacer notar que ninguno de estos compuestos es altamente tóxico en su estado nativo y pueden ser inyectados en la sangre sin producir mayores daños. Normalmente son absorbidos en la garganta y pasan a los pulmones, en donde son convertidos en tóxicos por una molécula inestable.

Algunas comidas son particularmente fáciles o comunes de contaminarse por aflatoxinas; cacahuates, algodón y arroz son solo algunos de los ejemplos. Debido a que el consumo de crema de cacahuete es muy alto, contribuye a ser un factor importante acerca del conocimiento de las aflatoxinas. Es posible eliminar la contaminación por estos compuestos implementando mejores técnicas en la agricultura y en el almacenamiento de alimentos (Christensen, 1976).

El hongo Aspergillus flavus Link., es de los más comunes ya que crece en todas las partes donde un organismo puede ser encontrado y en donde el contenido de humedad relativa sea de 85 a 90 por ciento. Aunque la producción de aflatoxinas no está restringida a unas cuantas cepas de A. flavus Link., sino que muchas cepas del hongo producen aflatoxinas y algunos pueden producir otras toxinas aún no identificadas. Mirocha et al. (1983), explica que la sola presencia del hongo no significa que las aflatoxinas estén presentes, ya que el hongo requiere de condiciones muy especiales para producir toxinas, esencialmente un alto

contenido de humedad y una temperatura adecuada para permitir un crecimiento vigoroso en unos cuantos días.

Otro hongo productor de compuestos tóxicos es Penicillium sp. Link., el cual es reportado por Christensen (1976), en un experimento en la Universidad de Minnesota en 1965, en el cual se obtienen 196 aislamientos, los cuales son cultivados en maíz húmedo y esterilizado en autoclave. Se les dió a ratas, pollos y patos produciendo en menos de siete días la muerte a los animales de prueba. Algunos de estos aislamientos de Penicillium sp. Link., producen la muerte de ratas en dos o tres días después de consumir unos cuantos gramos del grano invadido.

A este hongo lo relacionan Smith et al. (1971) y Smith et al. (1976), con el síndrome hemorrágico en aves, el cual es una enfermedad de gran importancia económica para los criadores de pollos en muchas partes del mundo. En Estados Unidos el síndrome hemorrágico ocupa el tercer lugar como causante de mortandad en la cría de aves sin causa conocida y alivio disponible.

También relaciona Hamilton (1982), una enfermedad que aparece en los pavos con síntomas, como las lesiones necróticas en el hígado. Esta enfermedad aparece en pavos de aproximadamente una semana de edad llegando al máximo en una o dos semanas más, para después declinar y desaparecer, no causa una mortandad severa pero puede afectar de un 10 a un 15 por ciento de las aves.

Wong et al. (1976), reporta que P. islandicum Sopp., da un color amarillento al arroz cuando lo invade y causa daño al hígado de ratones produciendoles tumores. Penicillium sp. Link., también es común en espaguetis , macarrones y algunos quesos madurados por especies de Penicillium sp. Link.

En Africa del Sur se hizo un estudio preliminar para determinar los contaminantes fúngicos de cereales cultivados en los que se encontraron muchos hongos tóxicos, incluyendo especies de Penicillium sp. Link., Fusarium sp. Link. y Aspergillus sp. Link. Uno de estos hongos Fusarium roseum Link., es muy común e induce la formación de lesiones en el hígado tan severas y extensas como las producidas por aflatoxinas.

Tabla # 1. Nos muestra el número de hongos probados en la Universidad de Minnesota y el número de hongos letales a ratas, 1965-1967.

Resultados obtenidos de los aislamientos de alimento.

Origen de los hongos.	<u>Número de aislamientos.</u> Probados. Letales.*	Porcentaje de aislamientos letales.
Cacahuete.....	396	40%
Maíz, alimento para animales y humanos..	573	58%
Total o promedio....	969	50%

- *Causan la muerte en menos de siete días al par de ratas a las que se les dió.
Tomado de Contaminación por hongos en granos almacenados, 1976. 199 pp.

Aspectos generales de las micotoxinas.

Una determinada muestra del alimento para animales que se sospeche contenga hongos toxigénicos y micotoxinas, representa un gran número de hongos cuando se cultiva en un medio con agar. De una sola muestra de alimento para animales se puede aislar una docena o más de géneros de hongos. Un aislamiento o cepa de un determinado hongo puede producir una toxina, sin embargo otra no lo hace, por lo que es necesario aislar varias cepas de cada uno de los hongos (Purchase, 1974).

Por otra parte las enfermedades que aparentan ser micotoxicosis son más prevalentes en la mitad y al final del invierno que en otras épocas del año. Tal sistema de incubación puede que no sea adecuado para otros hongos y otros climas. Después del período de incubación, el substrato invadido por el hongo se administra como alimento a los animales registrándose los efectos.

Generalmente se pretende usar como animales experimentales a la clase de animal en la cual, la enfermedad aparece, pero algunas veces esto es difícil debido a las condiciones del trabajo. En este caso se usan ratones como animales de prueba, no obstante que los ratones no son criados como animales para la producción de alimento y lo que es tóxico a una ratón puede no ser tóxico a una vaca y lo que

no es tóxico a una ratón puede ser muy tóxico a una vaca (Christensen, 1976).

Algunos investigadores que trabajan con micotoxinas cultivan los hongos en medios de cultivo líquido para inyectarlo en una fracción purificada, en forma oral o por la vía muscular aplicandolo a la piel rasurada de un ratón o conejo y la inflamación de la piel, ronchas o la muerte son señales de la presencia de la toxina.

Una vez que se encuentra que un hongo es tóxico a una clase determinada de animal experimental, es necesario llegar a la solución del problema, para lo cual se necesita extraer, purificar, determinar la naturaleza y características de la toxina o toxinas.

Algunos hongos producen toxinas que presentan gran dificultad para su extracción y purificación, pero hasta que estas toxinas no sean extraídas, purificadas y se desarrollen mejores técnicas para detectar su presencia en los alimentos, no hay otro medio para detectarlas.

Efectos de las micotoxinas.

a) Micotoxina (Zearalenona).

Esta micotoxina es producida por el hongo Fusarium sp. Link., el cual produce metabolitos estrogénicos que constituyen la toxina. Stoloff et al. (1971), encuentra que las concentraciones más grandes de 1 ppm. de Zearalenona se

consideran fisiológicamente representativas, esto basandose en respuestas observadas con animales de laboratorio.

La toxicidad, teratogenicidad y efectos en los procesos reproductivos en roedores son evaluados por Ghoshal et al. (1978) y Kriek et al. (1981), los cuales dicen que esta toxina al ser consumida por ratones en una proporción de 3 mg/kg. de peso corporal por día, aumenta el peso uterino en hembras, produce atrofia de ovarios, así como un gran número de abortos, al igual que nacimientos con individuos muertos y aumento de la actividad hormonal en machos.

b) Aflatoxina (B-1).

Son un grupo de metabolitos secundarios producidos por especies de Aspergillus flavus Link., estos metabolitos se han establecido como tóxicos en muchos sistemas biológicos incluyendo animales domésticos y de laboratorio (Mirocha, 1983).

De los animales de laboratorio los ratones son los menos susceptibles a los efectos crónicos y agudos de las aflatoxinas, pero son sumamente sensibles a la actividad cancerígena (Wong et al. 1976).

Una simple dosis de aflatoxina B-1 es al menos diez veces mayor en ratones, que en ratas del mismo sexo y edad (Wyllie et al. 1977).

De las principales lesiones producidas por una sencilla dosis de aflatoxina B-1 de 3 mg/kg. de peso, se

encuentra la necrosis de tejido en el hígado, cambios en cuanto a grosor, proliferación de células en el conducto biliar y después de 4 semanas de tratamiento se desarrollan nódulos pequeños de hepatocitos, neoplasmas en el hígado y carcinomas hepatocelulares (Newberne et al. 1971).

Akao et al. (1979), reporta que ratones envenenados directamente con aflatoxina B-1 presentan solo pequeños daños a nivel del hígado, pero desarrollan lesiones hemorrágicas en los riñones de 2 a 3 días después de la dosis.

El órgano que más daño sufre es el hígado, pero las infiltraciones adiposas y necrosis ocurren tanto en el corazón, estómago, órganos genitales y riñones.

Características de los hongos empleados.

Muchos trabajos se publican en todas partes desde que las aflatoxinas fueron descubiertas. Esto es debido a que son de los más potentes cancerígenos que se conocen y de hecho se supone que producen cáncer en los pulmones del hombre. Estas son producidas por dos hongos muy comunes, que crecen en alimentos almacenados, Aspergillus flavus Link. y Fusarium moniliforme Sheldon.

a) Aspergillus flavus Link.

Es descubierto por Link en 1809, es productor de la Aspergilosis que afecta principalmente el aparato

respiratorio, oídos, epidermis, uñas y aparato urinario. Presenta gramm positivo. Es cosmopolita y en el estado parasitario se ven filamentos hialinos cortos o ramificados y conidias de color verdoso claro; el medio de cultivo es el de Malta-Sal-Agar (MSA) y se incuba a una temperatura que va de los 25 a los 32 grados centígrados, presentando cabeza conidial de tamaño variable, los conidióforos son de paredes punteadas casi espinosas (ver Figura # 1), esterigmas en una o dos series, conidias piriformes o globosas, vesículas subglobosas. El color del cultivo es amarillo verdoso claro y después verde profundo. En la sangre en estados crónicos se observa eosinofilia (Barnett, 1962; Griffin, 1981 y Koneman et al. 1987).

b) Fusarium moniliforme Sheldon.

Es descubierto por Sheldon en 1810. Las especies de este hongo son la causa más común de queratitis micótica. Puede producir una endoftalmítis en los casos en los cuales hay penetración de la órbita, puede desarrollar hinchazón de la vulva y engrandecimiento de los pezones. También se han recuperado especies de Fusarium sp. con cierta frecuencia en lesiones cutáneas de pacientes quemados o en casos de infecciones cutáneas traumáticas y puede producir linfomas. Presenta gramm positivo. Este hongo es saprófito, se observan macroconidias y microconidias. Las macroconidias son cilíndricas, multicelulares y de forma de hoz (ver Figura #

2). Las microconidias se disponen en cabezuelas en la parte de arriba de cortas filíides delicadas. Este hongo tiende a producir pigmentos color lavanda, púrpura o rojo-rosado que colorean el micelio y el reverso del agar, el medio de cultivo es el de Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y se incuba a una temperatura media de 28 grados centígrados. (Barnett, 1962; Griffin, 1981 y Koneman et al. 1987).

Taxonomía. (Ainsworth, 1965).

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Tuberculariaceae.

Género: Fusarium sp.

Clase: Hyphomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

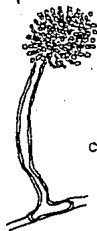
Género: Aspergillus sp.



A

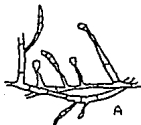


B

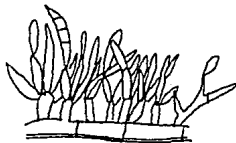


C

Figura # 1. Aspergillus flavus L. A, Tipo de arreglo; B, C, conidioforos con cabezas conidiales.



A



C



B



D

Figura # 2. Fusarium moniliforme S. A, hifa con conidioforos simples; B, otro tipo de conidioforos; C, un esporodoquio suelto formado por ramificación de conidioforos; D, conidias.

MATERIALES Y METODOS.

Para el desarrollo del presente trabajo se utilizan ratones de una semana de edad, comprados a una veterinaria. Se emplean 125 ratones, 75 machos y 50 hembras de la especie Mus musculus L. Se emplean cinco jaulas, las cuales tienen una población de 25 ratones cada una, 15 machos y 10 hembras en una relación de 3 machos por cada 2 hembras, esto debido a que los machos son más susceptibles a las toxinas que las hembras. Una jaula tiene a la muestra testigo, a la que se le da el alimento sin ningún cambio, la segunda jaula a los ratones con alimento mezclado con Zearalenona a una concentración de 6 ppm. en el alimento, la tercera jaula a los ratones con alimento mezclado con aflatoxina B-1 en una concentración de 6 ppm. en el alimento, la cuarta jaula a los ratones con alimento mezclado con la cepa del hongo Aspergillus flavus Link. y la quinta jaula a los ratones con alimento mezclado con la cepa del hongo Fusarium moniliforme Sheldon.

Después de alimentar a los ratones por un espacio de 13 días y pesandolos cada tercer día con la finalidad de poder detectarles algún cambio anímico, se procede a efectuar las disecciones para extraer los órganos, que en este caso son estómago, hígado y órganos genitales debido a que en dichos órganos es mayor la actividad de los dos tipos de

estándares de toxinas y de las dos cepas de hongos de nuestro interés (Butler, 1964 y Wong et al. 1976).

Se observan los cambios morfológicos (peso, color y forma) e histológico (células alteradas o necrosadas) en los órganos antes mencionados y se comparan con los órganos de los 25 ratones testigo para determinar los daños causados por cada tipo de alimento.

1.- Medios de Cultivo.

Los medios de cultivo que se utilizan para el aislamiento y purificación de hongos son; Papa-Dextrosa-Agar (PDA) para la cepa de Fusarium moniliforme Sheldon. y Malta-Sal-Agar (MSA) para la cepa de Aspergillus flavus Link. Debido a que en estos medios el crecimiento de cada cepa es más adecuado.

Koneman et al. 1987, describe la metodología para la elaboración de los medios de cultivo.

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

Se calientan 400 gr. de papa blanca pelada y cortada en trozos en un matraz Erlenmeyer de 2 litros que contiene 1,125 ml. de agua destilada durante 10 minutos.

A la infusión se le agregan 40 gr. de agar y 30 gr. de Dextrosa y se agita la mezcla.

Al matraz se le coloca un tapón de algodón y se esteriliza en autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Quince mililitros de medio de cultivo ya esterilizado se vacían en cada una de las cajas de Petri (previamente esterilizadas a 15 libras de presión por espacio de 3 horas).

Cuando el medio solidifica en las cajas de Petri, estas se incuban a una temperatura que está entre los 25 y los 30 grados centígrados durante 24 horas para evitar contaminación.

b) Medio de Malta-Sal-Agar (MSA).

Se calientan 136 gr. de cloruro de sodio (la cantidad de cloruro de sodio puede variar en hongos que necesitan mayor concentración osmótica) en 2 litros de agua destilada por 20 minutos.

A la mezcla se le agregan 40 gr. de agar y 20 gr. de extracto de malta y se agita.

Se coloca un tapón de algodón en la boca del matraz y se esteriliza en autoclave a 15 libras por espacio de 20 minutos.

Quince mililitros de medio de cultivo se vacían en cada una de las cajas de Petri (previamente esterilizadas a 15 libras de presión por espacio de 3 horas)

Cuando el medio se solidifica en las cajas de Petri, éstas son incubadas a una temperatura que está entre los 25 y los 30 grados centígrados durante 24 horas para evitar contaminación.

Para la elaboración de los medios de cultivo se utiliza material de vidrio marca Pyrex; una balanza granataria marca Ohaus; autoclave marca Presto con capacidad de 4 litros; la dextrosa de Productos Químicos Monterrey, S.A.; el agar de Bioxon de México, S.A. y la maltosa de J.T. Baker, S.A.

2.- Aislamiento de micoflora.

Para el aislamiento de los hongos en los 2 medios descritos anteriormente se realiza la siguiente metodología:

Se lavan 50 granos de maíz en agua destilada y esterilizada por 1 minuto y se pasan a una solución de

hipoclorito-agua destilada y esterilizada (2:1 v/v) por espacio de 1 minuto.

Con la ayuda de unas pinzas de disección se colocan 5 semillas lavadas y desinfectadas en cada caja de Petri con PDA y con MSA respectivamente, todo esto junto a un mechero Bunsen, para evitar contaminación.

Las cajas de Petri se colocan en el cuarto de incubación a 25 grados centígrados durante 7 días.

Al final de esta incubación, se observa el crecimiento de las colonias de hongos y se elaboran preparaciones para observarlas al microscopio y realizar la determinación a nivel de género.

Para el aislamiento y purificación de los géneros Aspergillus sp. Link. y Fusarium sp. Link., se resiembran ambas colonias encontradas en el análisis general de micoflora en los dos medios Malta-Sal-Agar (MSA) y Papa-Dextrosa-Agar (PDA) del siguiente modo:

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

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

Las cajas se incubaron a 25 grados centígrados durante 7 días.

Transcurrido el tiempo de incubación se revisan los cultivos, cuando se observa que solo hay una colonia por caja y que el crecimiento es a partir del centro, con características iguales a la colonia inicial, se considera ya, como cepa pura.

Para obtener una buena esporulación del hongo y así facilitar la determinación a nivel de especie de las cepas puras de Aspergillus sp. Link. y de Fusarium sp. Link., estas son sembradas respectivamente en los dos diferentes medios de cultivo Malta-Sal-Agar (MSA) y Papa-Dextrosa-Agar (PDA), descritos anteriormente.

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

3 - Multiplicación del hongo.

A partir de las cepas puras de Aspergillus flavus Link. y Fusarium moniliforme Cheldon, se procede a reproducir los hongos y sus toxinas en cultivos de maíz para Aspergillus

flavus Link. y en cultivos de arroz para Fusarium moniliforme Sheldon.

a) Reproduccion de los hongos en maiz y arroz.

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

La metodología para la elaboración de ambos medios (maiz y arroz), se describe a continuación:

Se utilizan 10 frascos de 1 litro de boca ancha, 5 de los cuales se les agregan 200 gr. de maiz a cada uno y a los 5 restantes 200 gr. de arroz a cada uno.

Posteriormente se agregan 180 ml. de agua destilada, dejándose reposar durante 1 hora.

A las tapas de los frascos se les hace un agujero de 2 cm. de diametro y a cada uno se le coloca un tapon de algodón.

Se agitan tanto el maiz como el arroz y se tapan los frascos. Despues se esterilizan en autoclave a 15 libras de presión durante 60 minutos.

Inmediatamente despues de la esterilización se agitan los frascos para despegar el maíz y el arroz.

Se dejan reposar a temperatura ambiente durante 24 horas.

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

Nuevamente se agitan los frascos después de la segunda esterilización.

En una mesa previamente esterilizada con hipoclorito de sodio y junto a dos mecheros Bunsen se inoculan, cortando 4 cuadros del medio de cultivo (MSA) con Aspergillus flavus Link. y 4 cuadros del medio de cultivo (PDA) con Fusarium moniliforme Sheldon., en los 5 frascos de maíz y en los 5 frascos de arroz respectivamente una vez ya frios, utilizando una aguja de disección.

Los medios de maíz y arroz inoculados se incuban a 25 grados centígrados durante dos semanas.

Durante los primeros días se agitan los frascos para facilitar la penetración uniforme del hongo en el maíz así como en el arroz.

Posteriormente los medios se incuban a 10 grados centígrados durante otras dos semanas.

El material utilizado fue Zea mays Linn. var. palomero y blanco, que se compra a granel en el mercado: arroz empacado por Aurrera, S.A.; frascos de vidrio de un litro; autoclave marca Presto con capacidad de 4 litros y un refrigerador marca Across.

b) Método de preparación de los alimentos.

La preparación de los cuatro tipos de alimentos para ratones, que en este caso son: alimento con la micotoxina Zearalenona, alimento con aflatoxina B-1, alimento mezclado con el inóculo en maíz de Aspergillus flavus Link. y por último el alimento mezclado con el inóculo en arroz de Fusarium moniliforme Sheldon., se efectúa de la manera siguiente:

Para los estándares de Zearalenona y de aflatoxina B-1 se muele un kg. para cada estandar de el alimento para ratones y se agregan 166.6 ml. de estandar diluido, ya sea de Zearalenona o de aflatoxina B-1 a una concentración de 6 ppm. y se revuelven cuidadosamente durante 15 minutos para buscar la uniformidad de la mezcla en cada alimento.

Para la preparación de cada alimento con los inoculos de Aspergillus flavus Link. y de Fusarium moniliforme Sheldon., se realiza de la manera siguiente:

Se procede a mezclar cada inóculo con el alimento para ratones, licuando por separado cada mezcla para una mejor uniformidad, hasta obtener un kg. de cada uno de estos.

Posteriormente se alimentan los cinco grupos de 25 ratones de la siguiente manera: a cada uno de los cuatro grupos con cada uno de los alimentos preparados; con el estándar de Zearalenona, el de aflatoxina B-1, el que tiene inóculo de Aspergillus flavus Link., el que tiene inóculo de Fusarium moniliforme Sheldon. y por último, al grupo de los ratones testigo con alimento sin mezclar.

4.- Determinación del hongo.

Se utiliza el tratado de Koneman et al. (1987) y el tratado de Nelson et al. (1983), para la determinación a nivel de especie del hongo.

El tratado mencionado consta de láminas en color de los cultivos de las especies más comunes y una sección de morfología en la cual se describen las estructuras de cada género y especie.

Las características consideradas para la identificación de los hongos utilizados en este trabajo son:

- 1) Las características generales de los cultivos (color, forma y crecimiento).
- 2) Tamaño y forma de los macroconidios.
- 3) La forma de las células basales y apicales de los macroconidios.
- 4) La formación en cadenas o falsas cabezas de macroconidios.
- 5) Los tipos de conidioforos (monofiálides y/o polifiálides).
- 6) La presencia o ausencia de clamidosporas.
- 7) La disposición o arreglo de las clamidosporas.

a) Estudio de microscopía óptica.

Se elaboran preparaciones semipermanentes con las cepas de Aspergillus sp. Link. y de Fusarium sp. Link., aislados de cada una de las muestras de alimento para la determinación de especie.

Junto a un mechero se toma una gota de alcohol del 70% y la muestra del micelio. Con dos agujas de disección se extiende el micelio y se coloca una gota de lactofenol.

Posteriormente, se coloca el cubreobjetos y se sella alrededor con barniz transparente.

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

Para la observación en el microscopio se usan los objetivos de 10x, 40x y 100x bajo el sistema óptico del microscopio compuesto de marca Carl Zeiss.

5.-Preparación de los estándares.

Los estándares utilizados son de la micotoxina Zearalenona y de la aflatoxina B-1, los cuales se encuentran en presentación líquida disueltos en metanol (CH₃OH), contienen 5 mg. de toxina por 5 ml. de solvente; de los 5 ml. se extrae 1 ml. y se afora a 166.6 ml. con metanol en un matraz, resultando una concentración de 6 partes por millón (6 ppm). Así los dos estándares que se utilizan tienen una concentración de 6 ppm. (cabe señalar que 5 mg. equivalen a 5000 ppm.).

El material que se utiliza en esta técnica es: cristalería marca Pyrex; una pipeta Pasteur marca Fisher Scientific Co. y las micotoxinas marca Sigma Chemical Company.

6.-Técnica histológica.

Se utiliza el método de la Parafina de Ham et al. (1975), debido principalmente a que se cuenta con el material para desarrollarlo. Este método consta de 5 pasos los cuales se explican detalladamente a continuación.

a) Fijación.

Es la operación destinada en la que se somete el tejido a un proceso de conservación morfológica y estructural por medio de un líquido fijador, el cual deberá tener una concentración del 30%.

El líquido fijador que se utiliza es el formol (formalina), ya que reúne bastantes requisitos, pues es rápido en su acción, muy penetrante, buen endurecedor y de pH 5.0.

Para un mejor resultado de este paso se debe mantener al tejido en un frasco con tapa para impedir la evaporación del fijador, de que el volumen del fijador cubra al tejido completamente y de que este proceso se desarrolle a una temperatura mayor a 23 grados centígrados ya que el frío retarda la fijación.

b) Deshidratación.

Se procede a extraer totalmente o parcialmente el líquido de el tejido, para lo cual:

1.-Se coloca el tejido en formol a menor

concentración de la que está en la fijación esto es al 10%.

2.-Se coloca posteriormente en agua.

Después se procede a colocar en alcohol el tejido, el cual se deshidrata gradualmente. El alcohol se aplica a diferentes concentraciones, las cuales van de manera ascendente de la manera siguiente:

1.-Alcohol de 50 grados.

2.-Alcohol de 70 grados.

3.-Alcohol de 85 grados.

4.-Alcohol de 95 grados.

5.-Alcohol de absoluto (de 96 grados).

6.-Alcohol Absoluto (de 96 grados).

- 7.-Se aplica una mezcla que se compone de 50% de alcohol absoluto (de 96 grados) y 50% de Xilol.
- 8.-Se aplica el Xilol al 100% el cual tiene como fin clarificar los tejidos y disolver la parafina.
- 9.-Parafina sucia.
- 10.-Parafina limpia la que substituye al Xilol y el tejido queda exclusivamente impregnado de parafina.

La permanencia del tejido debe ser de 1 hora en los alcoholes y parafinas, en el caso de el Xilol debe ser de 2 horas.

c) Inclusión.

En este paso se coloca el tejido en el seno de una masa plástica, para que se impregnen todos los elementos del tejido de esta. Para lo cual se utilizan moldes hechos con dos escuadras metálicas, conocidas como escuadras de Leuckart, las cuales se orientan de acuerdo al tamaño de la cavidad del microtomo.

La parafina se vierte en un molde hecho por las escuadras de Leuckart y en este se coloca el tejido

debidamente orientado para tener la mayor superficie, al realizar los cortes en el microtomo y cuidando siempre de que su temperatura no exceda los 60 grados centígrados ya que se quemaría el tejido. Una vez obtenido el molde de parafina, se pone en un recipiente con agua fría, después se pasa a un refrigerador para que alcance su máxima solidificación y así obtenemos el bloque deseado.

d) Microtomía.

Se coloca el bloque en el microtomo y se orienta de manera que la navaja de este quede paralela al bloque que se desea cortar. después se ajusta el microtomo para que realice los cortes a un grosor no mayor de 7 μ m. Los cortes hechos se extienden en un baño María con temperatura de 42 grados centígrados. Mientras tanto se preparan portaobjetos cubriéndolos con albumina de huevo, ya que ésta nos servira como fijador, dejándola secarse por espacio de 3 minutos en el portaobjetos antes de emplearla. Después de este tiempo, se extraen los cortes escogidos y se colocan en el portaobjetos cuidando de que no presenten desgarraduras o arrugas.

e) Coloración.

Se emplea la técnica de la Hematoxilina y la Eosina, la cual es la más común en este tipo de estudios ya que se puede utilizar para teñir cualquier tejido.

El procedimiento es el siguiente:

- 1.-El corte ya fijado en el portaobjetos se coloca en un recipiente con Xilol por espacio de 3 min.
- 2.-Se pasa a otro recipiente con alcohol absoluto (de 96 grados) por espacio de 3 min.
- 3.-Se pasa a otro recipiente con alcohol de 96 grados por espacio de 2 min.
- 4.-Se pasa a otro recipiente con alcohol de 70 grados por 2 min. y se lava con agua destilada.
- 5.-Se le aplica Hematoxilina de Harris por espacio de 5 min. y se lava para quitar el exceso de colorante con alcohol ácido.
- 6.-Se aplica una solución de Litio para virar el color por espacio de 2 min. y se lava con agua destilada.

- 7.-Se pasa a otro recipiente con Eosina por espacio de 4 min.
- 8.-Se pasa a otro recipiente con alcohol de 95 grados por espacio de 2 min. para quitar el exceso de colorante.
- 9.-Se pasa a otro recipiente con alcohol de 95 grados por espacio de 2 min.
- 10.-Se pasa a otro recipiente con alcohol absoluto (de 96 grados) por espacio de 2 min.
- 11.-Se pasa a otro recipiente con una mezcla de 50% alcohol absoluto (de 96 grados) y 50% Xilol por espacio de 2 min., 12o. Se le aplica Xilol opcionalmente.
- 12.-Se monta en Bálsamo de Canadá y se coloca un cubreobjetos para fijar el corte, teniendo como resultado la tinción del núcleo en un color azul y el citoplasma ligeramente anaranjado.

f) Microscopía óptica.

Se colocan las preparaciones de órganos en un microscopio con cámara fotográfica y se localizan los campos en los que la actividad de cada alimento sea más notable.

Se procede a comparar las variaciones celulares, como son: tamaño, forma y color celular, así como hematomas visibles y proliferaciones o descamaciones celulares.

El material que se utiliza en esta técnica es, Formol marca Baker, S.A.; frascos con tapa de 100 ml.; Alcohol industrial de 96 grados marca F.G.; Xilol marca Baker, S.A.; Parafina marca Merck de México, S.A.; Escuadras de Leuckart; Refrigerador marca Across; Charola metálica; Microscopio con cámara fotográfica tipo Macrophot 2, de marca Bausch & Lomb; Microtomo manual; baño María eléctrico marca Sunbeam; Aguja de disección; Termómetro marca Pyrex; Colorantes químicos marca Merck México, S.A.; Portaobjetos y cubreobjetos marca Kimex, S.A.

RESULTADOS.

Determinación de efectos del tratamiento en los ratones.

Los datos que se obtienen del efecto de cada alimento, en el peso y en el sexo de los ratones de la especie Mus musculus L., son los siguientes:

a) Alimento Testigo.

En este tratamiento no existen cambios y se observa un aumento gradual en el peso en ambos sexos.

El hecho de que las hembras en promedio tengan mayor peso que los machos, solo significa que éstas son de mayor talla que los machos (Tabla #2 y figura # 3).

b) Alimento con Fusarium moniliforme Sheldon.

En los primeros días se aprecia una reacción en los machos ya que suben de peso en una proporción mayor que las hembras. Después se observa una baja en el peso de los machos, mientras tanto las hembras los igualan en el peso. Al final del tratamiento las hembras ganan más peso que los machos (Tabla # 3 y Figura # 4).

c) Alimento con *Aspergillus flavus* Link.

En los primeros días se aprecia, que el peso en los machos es menor que el de las hembras y en ambos sexos hay un aumento gradual del peso. A la mitad del tratamiento, el peso en los machos aumenta más rápido que el de las hembras. Al final el peso de los machos es mayor al de las hembras (Tabla # 4 y Figura # 5).

d) Alimento con aflatoxina B-1.

El tratamiento actúa más rápido en las hembras ya que éstas siempre tienden a bajar su peso, mientras que en los machos hay un aumento en su peso. Después baja gradualmente el peso en los machos. Al final los machos pierden más peso del que tenían al principio y las hembras no alcanzan a recuperar peso, quedando éste en niveles bajos (Tabla # 5 y Figura # 6).

e) Alimento con micotoxina Zearalenona.

El tratamiento actúa lentamente en las hembras ya que no sufren ningún cambio de peso y en los machos el peso tiende a subir. Después los machos pierden peso, mientras que las hembras lo mantienen. Al final los machos pierden peso y quedan con el mismo que tienen al principio del tratamiento y las hembras bajan de peso (Tabla # 6 y Figura # 7).

Tabla # 2. Comparación del peso en ratones hembras y machos obtenidos en el alimento testigo. Control de peso cada tercer día. Todos los pesos en gramos.

1.- HEMBRAS:

	1	2	3	4	5
1)	21.4	21	21.4	21.5	21.6
2)	14.9	16.6	18.1	18.6	24.3
3)	17.5	18.8	21.2	21.4	21.6
4)	14.2	21.8	22.8	23.2	25.5
5)	14	15.6	16.7	17.8	19.7
6)	19.1	19.6	20.1	18.7	18.7
7)	18.6	21.3	21.7	22	22.6
8)	17.5	18.9	19.9	21	23
9)	19.9	21.3	22.2	22.8	23.5
10)	20	21	22.4	23	23.6

2.- MACHOS:

1)	16.6	19.7	22.1	23	25.8
2)	MUERTO ANTES DE ALIMENTARLO.				
3)	17.1	18.7	19.1	21	23.1
4)	16.2	18.1	22	22.3	22.9
5)	17.4	18.7	20.2	20.2	20.2
6)	14.4	18.7	19.6	22	23.6
7)	15.2	16.5	18.3	21	22.4
8)	13	16.6	20.9	22.8	23.4
9)	14.7	16	18.7	21.7	23.5
10)	20	23.6	24	23.9	23.9
11)	18.2	21.2	21.4	21.4	21.6
12)	19.5	21.7	22	22	22
13)	22	25.5	25.3	25.9	26.3
14)	19	17.2	19.2	19.2	19.2
15)	18.2	21	21.7	22	22.3

Comparación de peso. Hembras vs. Machos.
Alimento testigo.

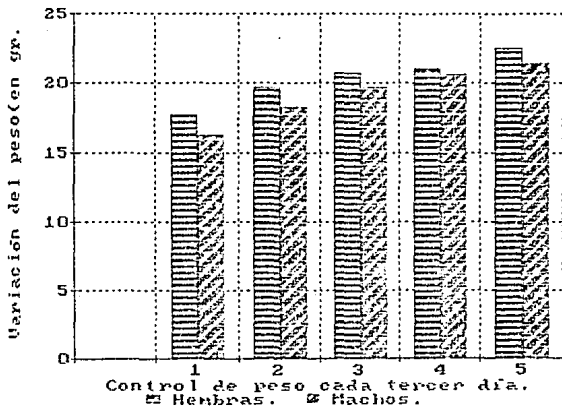


Figura # 3. Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie Mus musculus L. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.

Tabla # 3. Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en el alimento con Fusarium moniliforme S. Control de peso cada tercer día. Todos los pesos en gramos. Los datos subrayados son de los ratones más afectados.

1.-HEMBRAS:

	1	2	3	4	5
1)	<u>17.1</u>	<u>18.4</u>	<u>19</u>	<u>18.8</u>	<u>16.4</u>
2)	17.8	18.3	18.3	19.2	20.6
3)	12.4	15.2	16.1	17.4	19.7
4)	16.6	17	17	18.2	19.4
5)	13.9	16.7	17.3	18.4	19.3
6)	14.6	16.4	16.9	17.2	17.8
7)	17.6	18.2	18.9	18.9	18.9
8)	<u>16.3</u>	<u>17.2</u>	<u>17.7</u>	<u>17.6</u>	<u>17.3</u>
9)	<u>15.4</u>	<u>16.2</u>	<u>16.7</u>	<u>16.3</u>	<u>16</u>
10)	<u>18.9</u>	<u>18.8</u>	<u>19.6</u>	<u>19.5</u>	<u>19</u>

2.- MACHOS:

1)	17.4	16.6	18.5	19.2	19.8
2)	14.7	15.6	18.2	19.4	21.1
3)	15.3	18.2	18.6	19.9	20.2
4)	13.4	17.4	18.4	18.7	19.2
5)	18.2	19.7	21.7	21.7	21.7
6)	15.6	18.1	18.3	18.7	19.2
7)	17.7	20.9	21.4	21.5	21.7
8)	13.9	18.3	20.8	20.8	20.9
9)	<u>14.5</u>	<u>14.6</u>	<u>11.9</u>	<u>12</u>	<u>11</u>
10)	<u>23.5</u>	<u>20</u>	<u>20.9</u>	<u>21.2</u>	<u>21.6</u>
11)	18	15.3	SE ENCONTRÓ MUERTO.		
12)	<u>19.2</u>	<u>20.2</u>	<u>22.6</u>	<u>23</u>	<u>17.9</u>
13)	19.5	19.9	21	21.1	21.1
14)	<u>20.5</u>	<u>23.2</u>	<u>18.8</u>	<u>18</u>	<u>17.2</u>
15)	<u>20</u>	<u>21.8</u>	<u>20.5</u>	<u>16.5</u>	<u>15.7</u>

Comparación de peso. Hembras vs. Machos.
 Tratamiento con *Fusarium moniliforme* S.

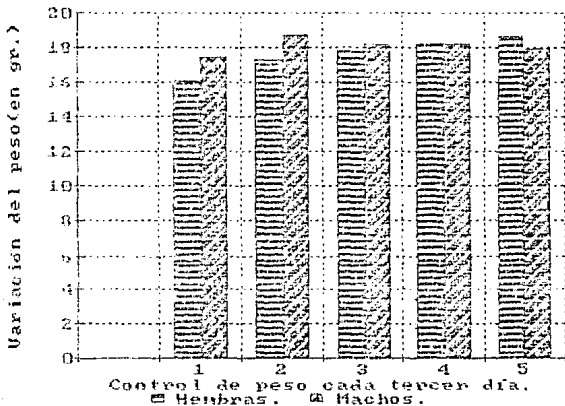


Figura # 4. Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie *Mus musculus* L. alimentados con *Fusarium moniliforme* S. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.

Tabla # 4. Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en el alimento con Aspergillus flavus L. Control de peso cada tercer día. Todos los pesos en gramos. Los datos subrayados son de los ratones más afectados.

1.- HEMBRAS:

	1	2	3	4	5
1)	14.9	18.6	18.8	19	20
2)	13.7	15.2	19.2	20.4	21
3)	17	17.4	17.1	18.3	18.9
4)	13.4	14.6	16.8	17.2	18.5
5)	<u>16.2</u>	<u>15.7</u>	<u>14.6</u>	<u>15.3</u>	<u>17.9</u>
6)	<u>17.1</u>	<u>18.2</u>	<u>16.7</u>	<u>16.9</u>	<u>17.6</u>
7)	18.9	18.5	19.9	20.1	20.2
8)	16	16.4	17.7	18.1	18.4
9)	19.5	20	20.7	21	21.3
10)	<u>20</u>	<u>18.6</u>	<u>18</u>	<u>17.9</u>	<u>17.2</u>

2.- MACHOS:

1)	14.7	15.7	18.7	19.1	20.3
2)	15.9	17.7	20.5	21.2	22.5
3)	13.9	14.9	17.8	18.4	20.8
4)	13.9	14.8	16.4	17.2	18.6
5)	15.8	14.7	14.7	15.3	17.7
6)	17.8	19.5	19.5	21.3	22.6
7)	15.4	16.6	18.7	19.9	20.6
8)	15.3	17	17.8	18.9	20
9)	11.7	14.9	18.4	18.9	19.5
10)	19	25.4	27.7	27.9	28.6
11)	15	20	21.1	21.4	21.6
12)	<u>19.3</u>	<u>19.5</u>	<u>19</u>	<u>18.7</u>	<u>18.5</u>
13)	<u>17.5</u>	<u>18.1</u>	<u>17.2</u>	<u>17</u>	<u>16</u>
14)	21.2	22.3	23.5	23.6	24.6
15)	20.6	22.3	24.8	25	25.6

Comparación de peso. Hembras vs. Machos.
Tratamiento con *Aspergillus flavus* L.

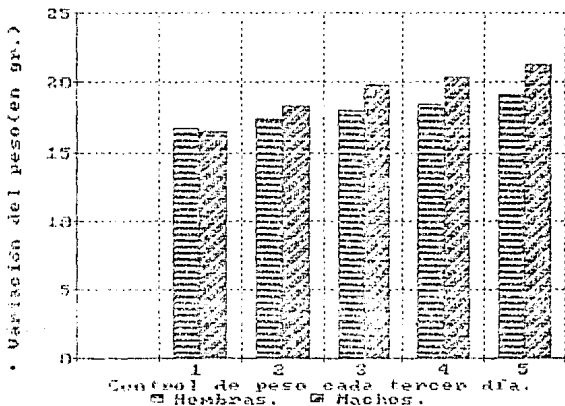


Figura # 5. Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie *Mus musculus* L. alimentados con *Aspergillus flavus* L. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.

Tabla # 5. Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en el alimento con aflatoxina B-1. Control de peso cada tercer día. Los datos subrayados son de los ratones más afectados

1.- HEMBRAS:

	1	2	3	4	5
1)	<u>17.4</u>	17	16.3	16	15.6
2)	<u>18.9</u>	19	16.4	15	15.2
3)	<u>18.4</u>	<u>18.3</u>	<u>18.3</u>	18	17
4)	<u>17.8</u>	<u>16.6</u>	16	15.9	15.3
5)	<u>16</u>	<u>15.2</u>	14.8	14.8	14.2
6)	<u>17.8</u>	18	18	17.5	17
7)	<u>21</u>	<u>17.9</u>	17	17	<u>16.8</u>
8)	<u>19.5</u>	<u>19.6</u>	16.7	15.9	15.4
9)	<u>18.6</u>	<u>18.8</u>	<u>18.4</u>	<u>17.9</u>	<u>17.2</u>
10)	<u>15.5</u>	<u>15.8</u>	<u>15.6</u>	15	14

2.- MACHOS:

1)	<u>14.1</u>	<u>17.1</u>	<u>17.5</u>	15	14.3
2)	<u>20.7</u>	<u>22.6</u>	<u>19.5</u>	21	22.6
3)	<u>19.5</u>	<u>20</u>	<u>19.2</u>	<u>20.9</u>	<u>17.2</u>
4)	<u>16.4</u>	<u>16.6</u>	<u>21.5</u>	17	<u>18.2</u>
5)	<u>18.7</u>	<u>18</u>	<u>17.1</u>	<u>17.2</u>	<u>16.3</u>
6)	<u>20.6</u>	<u>24.8</u>	<u>24.4</u>	<u>23.1</u>	<u>21.8</u>
7)	<u>19.5</u>	<u>20.6</u>	<u>20.1</u>	<u>20.1</u>	<u>20.1</u>
8)	16	17.1	17.6	17.7	17.7
9)	<u>20.1</u>	<u>21.7</u>	<u>17.8</u>	<u>17.6</u>	17
10)	<u>20.7</u>	<u>20.4</u>	20	<u>20.3</u>	<u>18.2</u>
11)	<u>18.5</u>	<u>20</u>	<u>17.9</u>	17	<u>16.4</u>
12)	<u>21.1</u>	<u>21.5</u>	<u>20.6</u>	<u>20.8</u>	<u>17.9</u>
13)	<u>16.1</u>	<u>18.6</u>	<u>20.2</u>	<u>20.4</u>	<u>17.6</u>
14)	<u>17.9</u>	<u>18.6</u>	<u>20.2</u>	<u>20.5</u>	<u>17.6</u>
15)	<u>19.6</u>	<u>20.5</u>	<u>18.8</u>	19	19.5

Comparación de peso. Hembras vs. Machos.
Tratamiento con aflatoxina B-1.

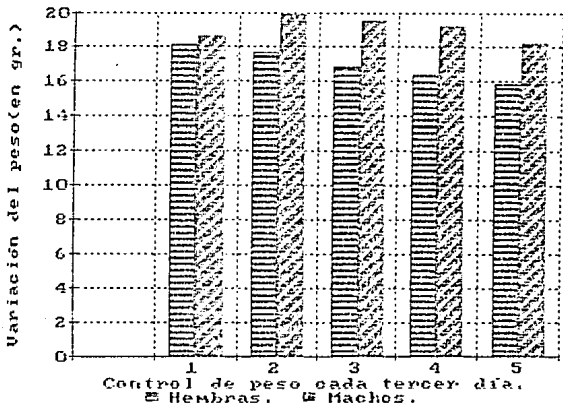


Figura # 6. Nos muestra la diferencia en promedio de los pesos de ratones hembras y machos de la especie *Mus musculus* L., alimentados con aflatoxina B-1. El promedio se obtuvo sacando la media del peso en cada tercer día.

Tabla # 6. Comparación del peso de hembras y machos, obtenidos en la mezcla de alimento con micotoxina Zearalenona. Control de peso cada tercer día. Los datos subrayados son de los ratones más afectados.

1.- HEMBRAS:

	1	2	3	4	5
1)	<u>17</u>	<u>16.8</u>	<u>16.2</u>	<u>15.9</u>	<u>15.4</u>
2)	<u>20.5</u>	<u>20</u>	<u>19.4</u>	<u>19.2</u>	<u>18.3</u>
3)	<u>16.5</u>	<u>15.7</u>	<u>15.9</u>	<u>16.7</u>	<u>14</u>
4)	<u>20</u>	<u>15.5</u>	<u>14.5</u>	<u>13.9</u>	<u>13.7</u>
5)	<u>17.1</u>	<u>17.4</u>	<u>17.8</u>	<u>17.3</u>	<u>16.1</u>
6)	<u>16.1</u>	<u>15.5</u>	<u>14.8</u>	<u>14.4</u>	<u>13.5</u>
7)	<u>21.2</u>	<u>20</u>	<u>20</u>	<u>21</u>	<u>21.4</u>
8)	<u>18.5</u>	<u>18.5</u>	<u>16.5</u>	<u>15.3</u>	<u>14.7</u>
9)	<u>18.6</u>	<u>19.7</u>	<u>20.7</u>	<u>22.2</u>	<u>23.4</u>
10)	<u>17.5</u>	<u>17.2</u>	<u>19.5</u>	<u>21.3</u>	<u>22.8</u>

2.- MACHOS:

1)	<u>17</u>	<u>18.6</u>	<u>18.6</u>	<u>18</u>	<u>18.9</u>
2)	<u>20.2</u>	<u>22.1</u>	<u>22.9</u>	<u>20.1</u>	<u>19</u>
3)	<u>15.5</u>	<u>16.9</u>	<u>16.8</u>	<u>15.9</u>	<u>14.5</u>
4)	<u>19.1</u>	<u>20.3</u>	<u>20.7</u>	<u>19.3</u>	<u>18.5</u>
5)	<u>18</u>	<u>19.7</u>	<u>17.1</u>	<u>17.4</u>	<u>16.4</u>
6)	<u>19.5</u>	<u>21.1</u>	<u>21.3</u>	<u>21.3</u>	<u>21.6</u>
7)	<u>21</u>	<u>23.2</u>	<u>23.7</u>	<u>23.9</u>	<u>24</u>
8)	<u>15.7</u>	<u>17.7</u>	<u>18.7</u>	<u>17.3</u>	<u>14.5</u>
9)	<u>17.5</u>	<u>17.7</u>	<u>18.2</u>	<u>16.6</u>	<u>15.4</u>
10)	<u>17.6</u>	<u>18</u>	<u>17.2</u>	<u>17</u>	<u>16</u>
11)	<u>20.5</u>	<u>23.2</u>	<u>22</u>	<u>22.2</u>	<u>19.3</u>
12)	<u>17.9</u>	<u>19.6</u>	<u>19.9</u>	<u>18.1</u>	<u>17.4</u>
13)	<u>18.5</u>	<u>20.4</u>	<u>21.1</u>	<u>21.2</u>	<u>21.8</u>
14)	<u>19.6</u>	<u>20.5</u>	<u>21</u>	<u>21.3</u>	<u>21.5</u>
15)	<u>15</u>	<u>18.7</u>	<u>18.2</u>	<u>17.4</u>	<u>16.2</u>

Comparación de peso. Hembras vs. Machos.
Tratamiento con micotoxina Zearalenona

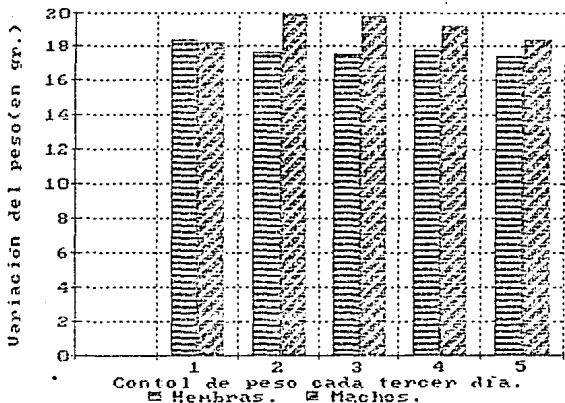


Figura # 7. Resultado de las medias del peso por sexo y cada tercer día, de los ratones de la especie *Mus musculus* L., alimentados con una mezcla de micotoxina Zearalenona y alimento para ratones. El promedio se obtuvo sacando la media del peso cada tercer día.

Daños en los órganos de los ratones.

Se determinan, por la observación nivel microscópico y macroscópico de los órganos de cada grupo de ratones en cada alimento, una vez que se realizan las disecciones.

a) En la jaula # 1 (testigo).

No se observan cambios de ninguna especie tanto en órganos como en peso en los ratones.

b) En la jaula # 2 (con Aspergillus flavus Link.).

Se observan cambios a nivel de hígado ya que lo presentan de mayores proporciones, con necrosamientos celular y en algunos caso pérdida del tejido conectivo, el estómago sufre cambios de tamaño muy leves, los órganos reproductores en los machos # 12, # 14 y # 15 se desarrollan en poco tiempo. Se encuentran derrames cerebrales en los ratones # 9 y # 11.

c) En la jaula # 3 (con Fusarium moniliforme Sheldon.).

Se encuentran cambios en el estómago ya que se presenta un aumento de tamaño considerable, el hígado presenta un aumento de tamaño leve, una coloración pálida, pérdida de continuidad en el endotelio que rodea a los sinusoides y posible desarrollo de carcinoma hepático. A

nivel de órganos reproductores los ratones # 12 y # 13 los presentaron desarrollados en poco tiempo.

d) En la jaula # 4 (con aflatoxina B-1).

Presentan una reducción considerable en el tamaño del estómago, el hígado presenta una reducción en su tamaño, una coloración muy viva, posible desarrollo de carcinoma hepático y deterioro del tejido conectivo que rodea a la Vena Central. Los órganos reproductores en machos se encuentran bien desarrollados.

e) En la jaula # 5 (con micotoxina Zearalenona).

Presentan una reducción considerable en el tamaño del estómago al igual que una coloración muy amarilla en éste, el hígado presenta una pérdida de tamaño y una coloración opaca, posible presencia de carcinoma hepático y alteraciones en el tamaño de los sinusoides. Los órganos reproductores se encuentran muy desarrollados en todos los machos y en las hembras # 1, # 2, # 3, # 4, # 9 y # 10.

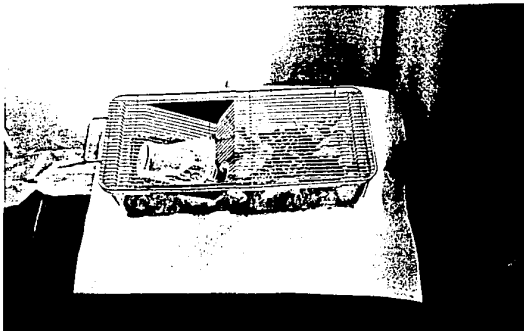


Figura # 8. Se muestra una de las jaulas empleadas en el experimento. En este caso son ratones machos los cuales están marcados con ácido Bórico.

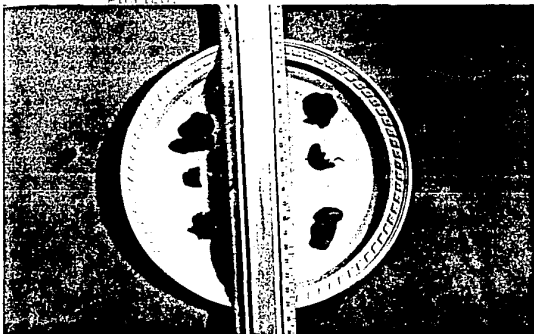


Figura 9.-Los órganos son de hembras. del lado izquierdo son del grupo testigo y los de la derecha son del grupo tratado con Zearalenona. Se aprecia una diferencia entre los estómagos (en medio) y los órganos genitales (abajo).

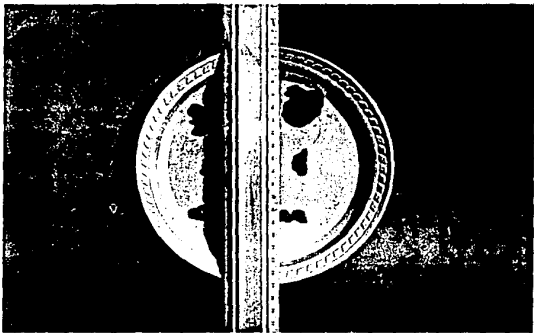


Figura # 10. Los órganos del lado izquierdo pertenecen a un raton macho del grupo testigo y los de la derecha a un raton macho del grupo tratado con Aspergillus flavus t. Obsérvese el tamaño de los testículos (abajo) y el tamaño y decoloración del hígado (arriba) del lado derecho.

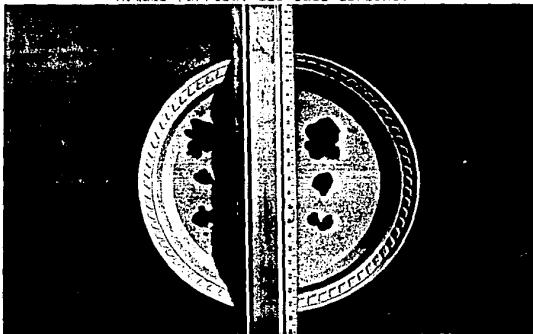


Figura # 11. Los órganos del lado izquierdo son de raton macho del grupo testigo y los de la derecha de raton macho del grupo alimentado con el hongo Fusarium moniliforme S. Obsérvese la decoloración tamaño del hígado (arriba) y el tamaño del estómago (en medio) del lado derecho.

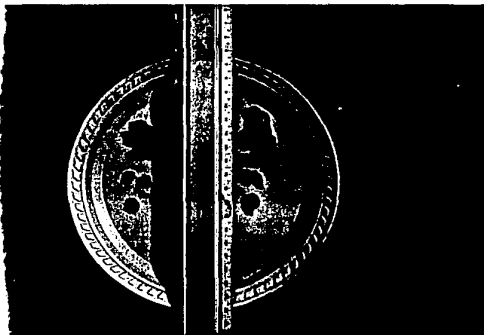


Figura # 12. Los organos son de machos. del lado derecho son del grupo testigo y los de la izquierda del grupo alimentado con aflatoxina B-1. Se aprecian diferencias de tamaño y color entre los estomagos (abajo) y los higados (arriba).

Análisis estadístico de los resultados.

Para determinar cual alimento es el que más daño ocasiona a los ratones, se efectúa una covarianza por sexo (una para machos y otra para hembras) con el fin de saber si los resultados obtenidos del pesaje son representativos de el experimento, después se aplica una prueba de comparaciones múltiples de Student-Newman para determinar que alimentos afectan anímicamente (en su peso y desarrollo) a los ratones.

Posteriormente se aplica un análisis de varianza (ANAVA) de clasificación simple para separar de la variación total observada las causas o factores parciales (Reyes, 1987). En este caso se aplica el análisis a cada sexo y a cada órgano disectado (hígado, estómago y órganos genitales). La variación total observada en este experimento se atribuye a:

- 1.- La variación que hay entre tratamientos o entre sexos.
- 2.- La variación dentro de cada tratamiento o de cada sexo.

a) Hembras.

En el análisis por covarianza con la prueba de comparaciones múltiples se obtiene como resultado, que el valor de w para la t de Duncan de 1% es de 3.000. Los resultados para cada alimento nos indican que si hay

diferencia significativa entre cada alimento a excepción del alimento testigo. Ya que entre el alimento que menos afecta, que es el de Aspergillus flavus Link. y el alimento testigo, hay una diferencia mayor a 3.000 (Tabla # 7).

Encontramos que el alimento que más afecta al peso de las hembras de la especie Mus musculus L. es el de la aflatoxina B-1 y el que menos afecta es el que contiene Aspergillus flavus Link.

Mientras que en el análisis de varianza se determinó que solamente en los valores de los estómagos disectados hay una gran variación entre las muestras, lo que nos indica que es el órgano más afectado en las hembras. En los valores para hígado y órganos genitales no se encontró significancia alguna.

b) Machos.

En el análisis por covarianza con la prueba de comparaciones múltiples se obtiene como resultado, que el valor de w para la t de Duncan de 1% es de 2.7952. Los resultados para cada alimento nos indican que si hay diferencia significativa entre cada alimento que afecta a los ratones y el alimento testigo es mayor al valor de w . Ya que entre el valor de el alimento que menos afecta, que es el de Aspergillus flavus Link. y el alimento testigo hay una diferencia mayor a 2.7952 (Tabla # 7)

Encontramos que el alimento que más afecta a los ratones machos de la especie Mus musculus L. es el de Fusarium moniliforme Sheldon. y el que menos afecto es el alimento con Aspergillus flavus Link.

Mientras que en el análisis de varianza se determinó que en los valores de los hígados y estómagos disectados hay una gran variación entre las muestras, lo que significa que son los órganos más afectados en los machos. En los valores para órganos genitales no se encontro significancia alguna.

Tabla # 7. Comparacion de los resultados obtenidos en el análisis estadístico de los diferentes alimentos.

Hembras: Micotoxina B-1.	<u>Fusarium sp.</u>	S. Zearalenona.
16.3816	17.2217	18.151
	<u>Aspergillus sp.</u>	L. Testigo.
	18.291	22.641

Machos: <u>Fusarium sp.</u>	S. Zearalenona.	Micotoxina B-1.
32.108	32.168	32.578
	<u>Aspergillus sp.</u>	L. Testigo.
	32.628	37.108

Se observa claramente que los valores obtenidos en los resultados estadísticos son mayores en los machos que en las hembras. Aunque la diferencia entre cada valor de las hembras es más notable que en los machos y tienden a presentar una mayor cercanía entre los mismos.

Resultados del análisis estadístico.
Hembras vs. Machos.

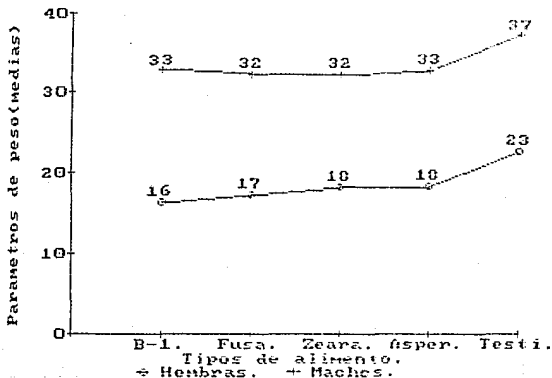


Figura # 13. En esta gráfica observamos los cambios en los resultados obtenidos del análisis estadístico por covarianza con la prueba de comparaciones múltiples y los parámetros en que se encuentran los valores del peso de hembras y machos de Mus musculus L.

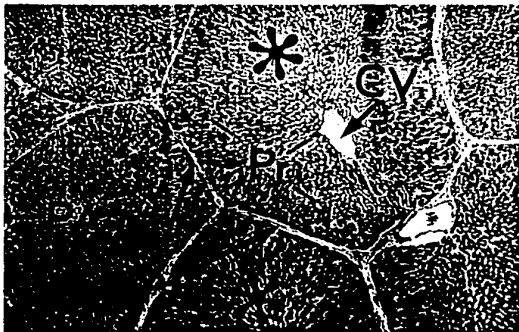


Figura # 14. Fotomicrografía de un corte de hígado normal en el que observamos la Vena Central (CV), Sinusoides (Pr), Tejido Conectivo Interlobulillar. 400x.

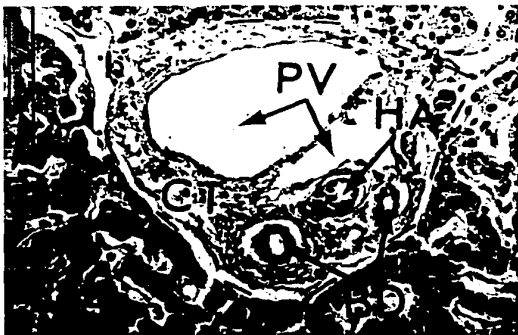


Figura # 15. En esta microfotografía de hígado normal se observan, la Vena Porta(PV), la Arteria Hepática (HA), el Conducto Biliar (BD), Tejido Conectivo (CT) y la Células de Kupffer (K). 400x.

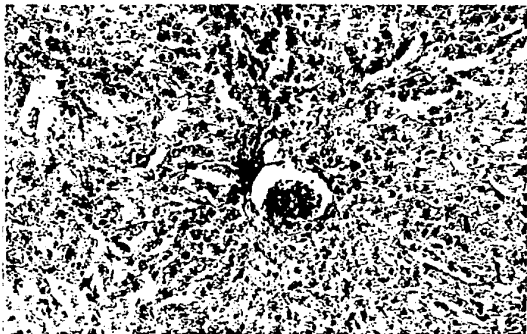


Figura # 16. Se observa un decoloramiento que denota un necrosamiento en las células y una pérdida del tejido conectivo. En un hígado de ratón macho tratado con Aspergillus flavus L. 400x.



Figura # 17. Se observa un deterioro en la continuidad de las células hepáticas y en los sinusoides. En hígado de ratón hembra tratado con Aspergillus flavus L. 400x.

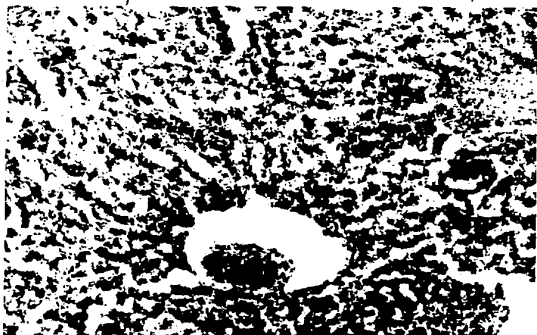


Figura # 18. Se observa un acumulacion muy notable en las células que forman las laminas hepaticas y la perdida de continuidad del endotelio que rodea a los sinusoides. En higado de raton hembra tratado con Fusarium moniliforme S. 400x.



Figura # 19. Se observa un necrosamiento en las células y posible carcinoma hépatico. En higado de raton macho tratado con Fusarium moniliforme S. 400x.

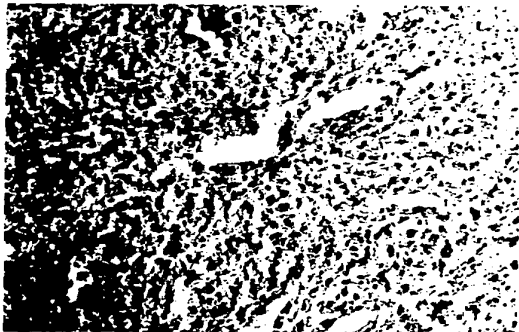


Figura # 20. Se observa una acumulación de células y posible carcinoma hepático unido con deterioro en el tejido conectivo que rodea a la Vena Central. En ratón macho tratado con aflatoxina B-1. 400x.

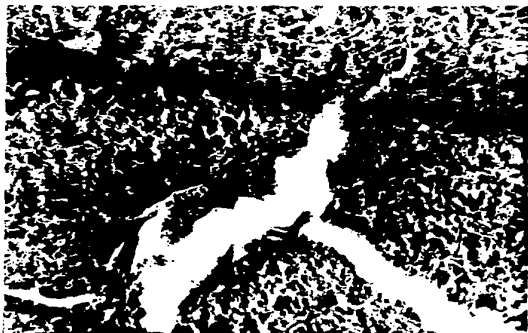


Figura # 21. Se observa una pérdida en el tejido conectivo que rodea a la Vena Central. En ratón macho tratado con aflatoxina B-1. 400x.



Figura # 22. Se observa necrosis de las células y posible presencia de carcinoma hepático, alteración tanto en los sinusoides que en algunas partes se encuentran muy reducidos y en otras muy grandes. En ratón macho tratado con micotoxina Zearalenona. 400x.

DISCUSION.

Se comprueba que las micotoxinas causan fuertes intoxicaciones a algunos órganos vitales de los ratones como son: estómago, hígado y órganos genitales. Burnside *et al.* (1970), reportó alteraciones bastante graves en las que se encuentra el hongo Fusarium moniliforme Sheldon. como causa principal, las alteraciones van desde aumento en el peso del útero al poco tiempo de consumir alimento contaminado hasta causar la muerte.

Los primeros síntomas de que las micotoxinas se encuentran alojadas en algún organismo son; pérdida de peso corporal (ver figuras # 3, # 4, # 5, # 6, # 7), además de elevar las actividad enzimática en el organismo dando origen a necrosis hepática, agrandamiento de órganos genitales y reducciones de tamaño a nivel digestivo (ver figuras # 9, #10, # 11 y # 12). Newberne *et al.* (1971), reporta una enfermedad en cabras en la que se encuentra como causa el alimento contaminado con Aspergillus sp. Link. y los síntomas clínicos y patológicos van de necrosis hepáticas a daños en en todo el sistema digestivo.

Las micotoxinas son acumulativas y aunque se deje de consumirlas están presentes en el organismo y no es sino hasta que se alcanza un nivel alto de éstas cuando se presenta el cuadro agudo de infección, lo que propicia agrandamiento, palidez y hemorragias en los órganos afectados

que en corto tiempo puede llevar a la muerte. Los investigadores Ghosal et al. (1978) y Kriek et al. (1981) reportan que el consumo continuo de micotoxinas por un individuo sano le causara la muerte en un periodo de tiempo que va de acuerdo a la dosis de micotoxinas consumidas, si es alta la dosis diaria, el individuo muere en poco tiempo y si es baja, se alargara su tiempo de vida para morir despues. Lo que ningun investigador ha dicho con respecto a las micotoxinas es si el consumo de una dosis alta de estas va a llevar al individuo directamente a la muerte, como resultado de un shock saturando a todos los tejidos o el efecto sera evolutivo y rapido, presentando el cuadro clinico de alteraciones, dando como resultado la muerte del individuo.

Cuando las lesiones son cronicas los organos se opacan y endurecen, existiendo formaciones de nodulos en el higado y proliferacion de celulas epiteliales; por lo cual podemos decir que los danos ocasionados con estos tratamientos a los ratones son leves, debido a que las dosis de 6 ppm., no es suficiente para el periodo de tratamiento de 13 dias (ver las figuras # 9, # 10, # 11 y # 12). Akao et al. (1979), explica que con una sencilla dosis de aflatoxina B-1, el raton presenta solo pequenos danos a nivel del higado, pero desarrolla lesiones en los riones despues de aplicar la dosis y al alargar el tratamiento el raton presentara un cuadro clinico en el que se afecta al higado, corazon, estomago, riones y organos genitales.

Debido principalmente a que no se conoce que cantidad de micotoxinas van a producir algun daño específico y tampoco se conoce el tiempo en el que hacen efecto ya, que depende del metabolismo de cada individuo se tomo como referencia a Stoloff et al. (1971) ya que dice, que las concentraciones mayores a 1 ppm. de micotoxinas se consideran fisiológicamente representativas y Akao et al. (1979) que en un período de 2 a 3 días con una sola dosis, obtuvo lesiones en los ratones.

Bottlico et al. (1980) y Caldwell et al. (1970), describen a las hembras como las principales afectadas por las micotoxinas. En el presente trabajo encontramos que los ratones hembras fueron los menos afectados por los cuatro tipos de alimento, posiblemente por el stress en el que se encontraban (stress causado por alta densidad de población en poco espacio).

En la realización de la técnica histológica la parte destinada a estómago y órganos genitales no se puede realizar la inclusión (ver Técnica Histológica pag. # 30) de la parafina debido al endurecimiento de los órganos antes mencionados.

CONCLUSIONES.

- 1.- Es necesario alargar el periodo de tratamiento para enfatizar los efectos de las micotoxinas y obtener resultados más claros. Se debe disminuir la dosis de las micotoxinas para evitar endurecimiento de órganos, muertes prematuras y poder observar todo el proceso toxicológico.
- 2.- Se observa que el alimento que menos afecta a los ratones machos y hembras es el que contiene la cepa de Aspergillus flavus Link. No por esto se deben de subestimar los efectos de la cepa y la toxina del hongo ya que son acumulativos.
- 3.- Al hacer los analisis estadisticos y observaciones al trabajo, se encuentra que las hembras son más susceptibles a los efectos del alimento con la aflatoxina B-1 y que los machos son más susceptibles al alimento con la cepa del hongo Fusarium moniliforme Sheldon.
- 4.- Las observaciones a nivel macroscopico y microscopico de los órganos de ratones disectados en los diferentes tratamientos comprobaron los efectos que tienen tanto los estándares de

micotoxinas, así como la cepa de Fusarium
moniliforme Sheldon, y la cepa de Aspergillus
flavus Link. en menor grado. Y a que los ratones
machos se ven mas afectados en general que las
hembras.

5.- En México es difícil obtener datos acerca de los
daños causados a la población, ya que la
información es muy restringida. El problema del
control de los hongos en granos y el de las
micotoxinas es muy delicado ya que nuestro país
no cuenta con la tecnología, ni el material para
su control. Al observar las alteraciones causadas
a los ratones, se debe de tener más conciencia
del problema, ya que nos muestra un peligro
latente para la salud humana y animal.

BIBLIOGRAFIA.

- Abbas, H.K., Shier, W.T. and Mirocha, C.J. 1984. Sensitivity of Cultured Human and Mouse Fibroblast to Trichothecenes. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67: 607-610.
- Ainsworth, G.C. 1965. The Fungi (An advanced treatise). 1st. ed. Academic Press: Inc. New York., U.S.A. Vol. I, II, III.
- Akao, M., Kuroda K. and Wogan G.N. 1979. Aflatoxin B-1: The kidney as a site of action in the mouse. Life Sci. 10: 495-501.
- Barnett, H.L. 1962. Illustrated genera of imperfect fungi. 2nd. ed. Burgess Publishing Company 426 Sixth Street, Minneapolis, Minnesota, U.S.A. 241 pp.
- Bottalico, A., Lerario, P. and Frisullo, S. 1980. Presenza di aflatossine, de zearalenona e di Aspergillus sp. produttori di aflatossine in campioni di farina di manioca. Zootech. Nutr. Anim. 6: 209-214.
- Buckley, S.S. and MacCallum, W.G. 1901. Accute hemorrhagic encephalitis prevalent among horses in Maryland. Amer. Vet. Rev. XXV: 99-102.
- Burnside, J.E., Sipell, W.L., Forgacs, J., Carll, W.T. Atwood, M.B. and E.R. Roll 1970: A disease of swine and cattle caused by eating moldy corn.II. Experimental production with pure cultures of molds. Am. J. Vet. Res. 18: 817-824.
- Burnett, J.H. 1976. Fundamentals of micology. 2nd. ed. Crane Russak & Company Inc. NY, NY. 673 pp.
- Butler, T. 1902. Notes on a feeding experiment to produce leucoencephalitis in a horse with positive results. Amer. Vet. Rev. XXVI: 748-751.
- Butler, W.H. 1964. Acute toxicity of aflatoxin B-1 in rats. Br. J. Cancer. 18: 756-762.

- Caldwell, R.W., Tuite, J., Stob, M. and Baldwin, R.
1970. Zearalenone production by Fusarium
sp. Appl. Microbiol. 20: 31-34.
- Chanh, K., Kurtz, H. and Mirocha, C.J. 1977. Effects
of the mycotoxin zearalenone on swine
reproduction. Am. J. Vet. Res. 40:
1260-1267.
- Christensen, M.C. 1975. Molds, Mushrooms and
Mycotoxins. 1st. ed. North Central
Publishing Company, University of
Minnesota Press, Minneapolis, Minnesota.
264 pp.
- Christensen, M.C. 1976. Contaminación por hongos en
granos almacenados. 1a. ed. Pax. México,
D.F. 199 pp.
- Christensen, M. C. 1979. Zearalenone. Conference on
mycotoxins in animal feeds and grains
related to animal health. PB-300-300. U.S.
Dep. Commerce, Nat. Tech. Inform. Serv.,
Washington, DC. 79 pp.
- Christensen, M.C., Nelson, G.H. and Mirocha, C.J.
1967. Effect on the white rat of a toxic
substance isolated from Fusarium sp.
Appl. Microbiol. 3: 655-659.
- Deacon, J.W. 1960. Introduction to modern micology.
1st. ed. Blackwell Scientific, Oxford,
England. 127 pp.
- Eugenio, C.P., Christensen, C.M. and Mirocha, C.J.
1976. Factors Affecting Production of the
Mycotoxin F-2 by Fusarium roseum.
Phytopathology 60: 1055-1057.
- Ghosal, S., Biswas, K., Srivastava, R. S.,
Chakabarti, D. K. and Chaudhary, K. C.
B. 1978. Toxic substances produced by
Fusarium sp. V. Occurrence of
zearalenone, diacetoxyscirpenol and T-2
toxin in moldy corn infected with
Fusarium moniliforme. J. Pharm. Sci. 67:
1768-1769.
- Goldblaft, C.A. 1972. Implications of mycotoxins.
Clinical Toxicology. 5: 453-464.

- Graham, R. 1935. Results of inoculating laboratory animals with equine brain-tissue suspension and equine brain-tissue filtrates from spontaneous cases of so-called cornstalk disease. J. Amer. Vet. Med. Assoc. 86: 778-780.
- Griffin, David H. 1961. Fungal Physiology. 6th. ed. Jhon Wiley & Sons, Inc. NY, Syracuse. 585 pp.
- Ham, Arthur W. 1975. Tratado de histología. tr. de Alberto Folch P. y de Santiago Sapiña R. 7a. edición. Compañía Editorial Interamericana. México, D.F. 966 pp.
- Hamilton, P.B. 1971. Determining safe levels of mycotoxins. Journal of Food Protection. 47: 570-575.
- Hamilton, P.B. 1982. Mycotoxins and farm animals. Refuah Veterinarith. 39: 17-45.
- Hesseltine, C.W. 1979. Introduction, definition and history of mycotoxins of importance to animal production. In interactions of Mycotoxins in Animal Production. National Academy of Science (U.S.A.), Washington, D.C. Pp. 3-18.
- Juungerman, Paul F. 1977. Micología médica veterinaria. 1a. edición. Compañía Editorial Continental. México, D.F. 240 pp.
- Kellerman, T.S., Marasas, W.F.O., Piemnar, J.G. and Naude, T.W. 1972. A micotoxicosis 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 toxicity of Fusarium verticillioides (= F. moniliforme) to horses, primates, pigs, sheep, and rats. Onderstepoort J. Vet.Res. 48: 129-131.

- Koneman, Elmer W. Glenn D. Roberts. 1987. *Mitología práctica de laboratorio*. tr. de Nora Graciela Meeroff. 3a. edición. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 221 pp.
- Mirocha, C.J. and Christensen C.M. 1983. *Mycotoxins. Store of cereal grains and their products*. Academic Press. U.S.A. 247-296.
- Mirocha, C.J., Christensen C.M. and Nelson G.H. 1982. Physiologic activity of some fungal estrogens produced by Fusarium sp. *Cancer Res.* 28: 2319-2322.
- 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.
- Newberne, P. M. and Butler, G. H. 1971. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals. A review. *Cancer Res.* 29: 236-556.
- Pathre, S.V. and Mirocha, C.J. 1977. *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publishers, Park Forest South, ILL., U.S.A. 227-253.
- Purchase, I.F.H. 1974. *Mycotoxins*. Elsevier Scientific Publishing Company. 1st. ed. The Netherlands. Amsterdam. 385 pp.
- Reyes, C.P. 1987. *Bioestadística Aplicada, Agronomía, Biología y Química*. 4a. ed. Trillas S.A. de C.V. México, D.F. 216 pp.
- Smith, J.W., Hill, C.H. and Hamilton, P.B. 1971. The effect of dietary modification on aflatoxicosis in the broiler chicken. *Poultry Science.* 50: 768-774.
- Smith, R.B., Griffin, J.M. and Hamilton, P.B. 1976. Survey of aflatoxicosis in farm animales. *Applied Environmental Microbiology.* 31: 385-388.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

- Stoloroff, L., Neshaim, S., Yin, L., Rodricks, T., Stack, M. and Campbell, A.D. 1971. Multimycotoxin detection method for aflatoxins, ochratoxins, zearalenone, sterigmatocystin and patulin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54: 86-98.
- Wong, J. J. and Hsieh, D.P.H. 1976. Mutagenicity of aflatoxin related to their metabolism and carcinogenic potential. Proceedings of the National Academy of Science. 73: 2241-2244.
- Wyllie, D.T. and Morehouse G.L. 1977. Mycotoxic fungi, mycotoxins and mycotoxicoses: An encyclopedic hand book. 2a. Edicion. Ed. Marcel Dekker, New York, U.S.A. Vol. I, II, III.