



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

EFFECTO DE LA INTERACCIÓN DE AFLATOXINAS Y
FUMONISINAS EN POLLO DE ENGORDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:
ERNESTO MARÍN FLAMAND

ASESOR: Dr. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA
COASESORES: Dr. CAROLINA MORENO RAMOS
Dr. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

DEDICATORIA.

A mis padres.

Siempre he pensado que un buen principio se traduce en buenos resultados, y que mejor principio tuve con ustedes dos, no puedo pedir mejores padres, ustedes son mi inspiración, con ustedes he aprendido, el valor del trabajo, de la lucha social, de lo que es ser un buen mexicano, el valor de la dignidad y la honestidad, que tengo yo que hablarles...

Si ustedes son los poetas...

A mi hermana.

No lo digo con mucha frecuencia pero eres mi persona favorita, porque a pesar de que desde el principio la vida te puso grandes obstáculos, para ti no importan, has logrado definirte como persona, con tu carácter fuerte, muchas veces difícil de manejar, pero hermoso al fin, vives tu vida mucho más feliz de lo que las otras personas lo hacemos, te quiero mucho y siempre estaré a tu lado.

A mis abuelos.

Siempre han sido una inspiración, de honestidad, trabajo duro y espiritualidad, gracias por el tiempo que compartieron conmigo, ojala y la vida me hubiera dado un poco más...

A mi asesor y mis coasesores.

Juan Carlos gracias por tu apoyo incondicional, porque siempre has sido y serás mi guía, porque me has enseñado el valor de la investigación y de la vida académica, se que ahora solo es el principio y me falta mucho camino por recorrer, ojala y la vida me permita recorrerlo junto a ti, gracias por los consejos, todo el conocimiento que has compartido, y gracias por tu amistad.

Carolina y Dr. Moreno, gracias por ayudarme siempre, sin ningún interés, solo acaso mi superación académica.

A mis profesores y compañeros de trabajo.

Dra. Lucia García, Dr. Francisco Morales, Dr. Víctor Quintero, Dra. Blanca Moreno, Dr. Guillermo Valdivia, Dr. Alejandro Sánchez, Dr. Jorge Tortora y a todos y cada uno de mis profesores, gracias por compartir su conocimiento y su apoyo, son en muchos aspectos un ejemplo a seguir.

A mis amigos.

Víctor, Ana María, Omar, Cynthia, Emma, Israel, Mayra, Rafa, Mary Carmen, Roy, Yeri, Juan Barrientos, Abraham Méndez, Norhan, Carlos Vidal, Aurelia, Enano, Mariel, Paulina, Carlos Juárez, Luis Fernando, Antoua, Valeria, Hugo, Juan Reyes, Rulo, Alejandro Ramírez... el orden no es importante los quiero a todos, y les agradezco que pueda llamarlos amigos.

A todas las mujeres con las que he compartido un tiempo de esta vida, y con las que he pasado grandes e inolvidables momentos, siempre tendrán una parte de mi corazón...

AGRADECIMEINTOS.

A la **Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – Universidad Nacional Autónoma de México** por ser la punta de lanza en la educación superior en México, y por darme la oportunidad de ser parte de ella.

A la **Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS)** y a todo su personal que me ayudaron a la realización del presente trabajo.

A la **Sección de Patología del Departamento de Ciencias de la Salud Animal**, por permitirme formar parte de los profesores e investigadores que en ella laboran.

A la **Coordinación de la Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la FES-Cuautitlán**, por su apoyo logístico y personal en la presentación del presente trabajo.

ÍNDICE.

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Situación actual de la producción de carne de pollo.....	1
1.1.1. Tendencias históricas de la producción de carnes en México	2
1.1.2 Insumos alimenticios	3
1.2 Consideraciones sobre hongos y micología	5
1.3 La historia y generalidades sobre las micotoxinas.....	7
1.3.1 Generalidades.....	8
1.4 Producción de micotoxinas en alimentos.....	10
1.4.1 Factores Físicos.....	10
1.4.2 Factores Químicos.....	12
1.4.3 Factores Biológicos.....	13
1.4.5 Relación hongo-micotoxina.....	14
1.5 Contaminación por micotoxinas de alimentos compuestos para animales	14
1.6 Métodos para la detección de la presencia de micotoxinas en alimentos	16
1.6.1 Métodos basados en HPLC (High Performance Liquid Cromatography).....	16
1.6.2 Métodos basados en ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	17
1.6.3 Métodos basados en Cromatografía de columnas de inmovinoafinidad.....	19
1.7 El género <i>Aspergillus</i>	20
1.7.1 Clasificación Taxonómica	20
1.7.2 Descripción y hábitad natural.....	20
1.7.3 Producción de Micotoxinas por <i>Aspergillus Flavus</i>	21
1.7.4 Las aflatoxinas producidas por <i>Aspergillus Flavus</i>	22
1.7.5 Las aflatoxinas su absorción, biotransformación y toxicidad.....	23
1.7.6 Aflatoxicosis en pollos	28
1.8 El género <i>Fusarium</i>	33
1.8.1 Clasificación Taxonómica	33
1.8.2 Descripción y hábitad natural.....	33
1.8.3 Producción de Micotoxinas por <i>Fusarium moniliforme</i>	33
1.8.4 Las fumonisinas su mecanismo de acción y toxicidad.....	35
1.8.5 Fumonitoxicosis en pollos.....	36
1.9 Interacción de aflatoxina y fumonisina	38
2.- OBJETIVOS	39
3.- HIPOTESIS	40

4.- JUSTIFICACIÓN.....	41
5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
5.1 Metodología.....	42
5.1.1 Etapa 1. “Producción, estandarización de toxinas y preparación de dietas”.....	42
5.1.2 Etapa 2. “Aplicación de dietas y toma de muestras”.....	44
5.1.3 Etapa 3. “Procesamiento de muestras y análisis de muestras”.....	46
5.1.4 Etapa 4. “Análisis estadístico”.....	46
6.- RESULTADOS.....	47
6.1. Peso de los animales.....	47
6.2. Consumo de alimento.....	47
6.3 Conversión alimenticia.....	48
6.4 Pruebas de daño hepático.....	49
6.4.1 ALT.....	49
6.4.2 AST.....	49
6.5 Prueba de la inhibición de la hemoaglutinación. (HI).....	50
6.6 Peso hepático.....	50
6.7 Porcentaje de Hematocrito.....	51
7.- DISCUSION.....	52
8.-CONCLUSIONES.....	56
-APENDICE 1 (FIGURAS).....	57
-APENDICE 2 (TABLAS).....	62
9.- REFERENCIAS.....	66

1.- INTRODUCCIÓN.

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA PRODUCCIÓN DE CARNE DE POLLO EN MÉXICO.

Las actividades pecuarias mantienen una gran importancia en el contexto socioeconómico del país y al igual que el resto del sector primario, han servido de base al desarrollo de la industria nacional, ya que proporcionan alimentos y materias primas, divisas, empleo, distribuyen ingresos en el sector rural y utilizan recursos naturales que no tienen cualidades adecuadas para la agricultura u otra actividad productiva. La ganadería, y en específico la producción de carne, es la actividad productiva más diseminada en el medio rural, pues se realiza sin excepción en todas las regiones ecológicas del país y aún en condiciones adversas de clima, que no permiten la práctica de otras actividades productivas. (Lastra *et al*, 2000), (Gallardo *et al*, 2004).

Se estima que en total la superficie aprovechada por la ganadería es superior a los 110 millones de hectáreas, representando aproximadamente el 60% de la superficie del territorio nacional, en donde 107.8 millones de hectáreas corresponden a pastizales y más de 2 millones son superficies agrícolas cuyo producto se destina fundamentalmente al consumo animal (granos forrajeros y forrajes de corte). (Lastra *et al*, 2000).

La producción de carne, como otras actividades del subsector ganadero, se da en una amplia gama de sistemas productivos, que van desde los altamente tecnificados e integrados, hasta las economías de tipo campesino orientadas principalmente hacia el autoabastecimiento de la familia campesina. (Lastra *et al*, 2000), En el país, el desarrollo ha implicado, además de un crecimiento demográfico acelerado, la migración y concentración de la población en medianos y grandes centros urbanos. Lo anterior ha tenido un fuerte impacto en la demanda y en los hábitos de consumo, requiriéndose sistemas de producción que puedan generar volúmenes suficientes de alimentos de origen animal para abastecer a las grandes ciudades, situación que ha condicionado el diferente comportamiento de las ramas de la producción de carne. (Lastra *et al*, 2000), (Gallardo *et al*, 2004).

Este crecimiento en la producción ganadera impulsó a la avicultura a alcanzar los mayores niveles de incremento. En paralelo a lo anterior, una planta productiva avícola con elevados niveles de productividad, logró traducir los bajos precios de los insumos alimenticios como los granos y las pastas oleaginosas, en un producto de alta calidad y con precios decrecientes al consumidor, lo que incrementó en mayor medida el mercado de este producto. (Gallardo *et al*, 2004).

La producción en 2005 fue de 2,436 534 toneladas, 6.43% superior a la de 2004, en tanto que las importaciones, principalmente para el abasto de la industria empacadora, se mantuvieron en el orden de las 360,750 toneladas. (Fig. 1.1) Por su parte las exportaciones registraron un importante descenso porcentual, ya que solamente alcanzaron las 21.8 toneladas. (Coordinación General de Ganadería, SAGARPA, 2005).

Con base en lo anterior se determina que el Consumo Nacional Aparente (CNA) de carne de pollo se situó en 2,797,262 toneladas, en términos generales 7.2% superior a la del año 2004, con base en lo cual la disponibilidad por habitante al año fue prácticamente de 26.3 kg., consolidándose como la carne más consumida en México, absorbiendo más del 43.6% del mercado de carnes de nuestro país. (Coordinación General de Ganadería, SAGARPA, 2005).

1.1.1. Tendencias históricas de la producción de carnes en México

Históricamente esta tendencia a la alza se ha mantenido ya que a principios de la década de los 90's, la composición de la producción de carnes en México se daba en un 37% por la de bovino, 34% por porcino y 29% por pollo. Sin embargo por los diferentes cambios en la producción y en la economía del país para el año de 2005 la conformación se transforma radicalmente para constituirse en un 46% por pollo, 27% por carne de bovino y 27% por carne de porcino, manteniéndose a lo largo de esos 15 años una participación marginal del resto de las carnes en el orden del 1 y el 2%. (Fig. 1.2). (Coordinación General de Ganadería, SAGARPA, 2005), (Gallardo *et al*, 2004).

1.1.2 Insumos alimenticios

Al igual que en otras ramas de la producción ganadera, el aumento de los volúmenes de producción avícola conlleva al crecimiento de su consumo de alimentos balanceados y, por tanto, de granos forrajeros y pastas oleaginosas o granos oleaginosos, los que conforman parte fundamental de las dietas aplicadas para obtener los mayores niveles de productividad, aprovechando para ello el potencial productivo que la mejora genética confiere a las aves de engorda. (Gallardo *et al*, 2004).

Se estima que durante 1999 la engorda de pollo, así como el mantenimiento del pie de cría requirió de 3.5 millones de toneladas de granos forrajeros lo que implicó un crecimiento del 5.8% en esta demanda. Al comparar esta expansión con respecto a la del volumen de la producción, se determina que es menor, lo que es el resultado directo de un incremento en la productividad de las aves, el cual se traduce en una menor cantidad de granos y en términos generales de alimento balanceado, para obtener un kilogramo de carne. (Gallardo *et al*, 2004), (Coordinación General de Ganadería, SAGARPA, 2005).

En el caso de las pastas oleaginosas, los consumos durante 1999 se ubicaron en el orden de 1.2 millones de toneladas, en sí 5.8% superior al del año precedente. (Coordinación General de Ganadería, SAGARPA, 2005), (Fig. 1.3)

Con estos niveles de consumo, la avicultura productora de carne se mantiene como la primer área demandante de granos, los que representan el 24% y el 35% de los requerimientos globales de la ganadería por granos y pastas. (Coordinación General de Ganadería, SAGARPA, 2005).

No se dispone de información que permita asegurar cuál es la composición en el consumo de granos forrajeros por parte de la avicultura; sin embargo, por estimaciones propias de la Dirección General de Ganadería SAGARPA, México, ésta señala que dos son los principales, siendo el sorgo y el maíz, los que en conjunto representaron de 1990 a 1999 el 95% del abasto de estos insumos para la ganadería en general. La preferencia por el consumo de éstos se sustenta en los niveles de ofertas y precio, así como en la calidad de la

energía que proporcionan, entre otros. El 5% restante se encuentra compuesto por: cebada, trigo y avenas, los cuales son incorporados en ciertas zonas del país, debido a la oferta que de ellas se tiene y los precios a los que se cotizan, correspondiendo en la mayoría de los casos a excedentes sin colocación en el mercado. Caso específico del abasto de estos insumos es el maíz, por la fuerte competencia que se registra con el consumo humano y la importante producción nacional, lo que conlleva a controles a la importación, negociados en el marco de los acuerdos comerciales de México, autorizándose importaciones de este grano para el sector ganadero en forma complementaria a la oferta de otros granos. El sorgo se ubica como la principal fuente de abasto de granos para la ganadería, con un promedio del 68% de 1990 a 1999, en tanto que el maíz ha medido el 27%. (Fig. 1.4), (Lastra *et al*, 2000).

Todo lo anterior subraya la importancia de los insumos alimenticios en la producción avícola (Gallardo *et al*, 2004), por lo que es de suma prioridad, la calidad y el valor nutritivo de estos insumos por lo que se tienen que tomar medidas preventivas y correctivas para garantizar la calidad en los mismos.

Existen una serie de factores que modifican la calidad tanto nutritiva como organoléptica de estos insumos alimenticios traduciéndose en deficiencias y pérdidas en la producción, son muchos los factores que afectan a los alimentos pero de los principales rubros podemos mencionar:

- Contaminación por insectos.
- Contaminación por microorganismos patógenos.
- Contaminación por sustancias químicas.
- **Contaminación por hongos.**

La presente tesis se enfocará principalmente en el problema de contaminación por hongos y sus micotoxinas en los alimentos para la producción avícola.

1.2 CONSIDERACIONES SOBRE HONGOS Y MICOLOGÍA.

El diccionario de la Real Academia Española de la Lengua define a los hongos como: “*(Del lat. fungus). m. Planta talofita, sin clorofila, de tamaño muy variado y reproducción preferentemente asexual, por esporas. Es parásita o vive sobre materias orgánicas en descomposición. Su talo, ordinariamente filamentosos y ramificado y conocido con el nombre de micelio, absorbe los principios orgánicos nutritivos que existen en el medio*”. (Real Academia Española, 2003).

Sin embargo esto no es completamente cierto ya que durante mucho tiempo se han considerado dentro del reino vegetal, a pesar de carecer de clorofila y de presentar una serie de características muy diferentes a las de las plantas, ya que todos los seres vivos pueden ser clasificados dentro de de unos de los cinco reinos de la vida (monera, protista, fungí, animalia y platae), el termino hongo se refiere a todos los miembros del reino Fungí (Gimeno, 1999).

Los hongos son parásitos de plantas cultivadas, productores de notables antibióticos, fundamentales en muchos procesos de fermentación y algunos apreciados como alimento, estas son algunas de las múltiples facetas de estos organismos. (Gimeno, 1999). Tanto unicelulares como pluricelulares, los hongos son organismos eucariontes de los cuales se han descrito cerca de 100,000 especies, si bien se calcula que el número de estas puede acercarse a las 250,000. Se encuentran en habitas muy diversos y pueden desarrollarse en medios acuáticos, en el suelo, en el aire, sobre partículas en suspensión a expensas de las plantas y de los animales, a los que muchos de ellas parasitan; aparecen ahí donde exista cierto grado de humedad. (Ramesh *et al*, 1999).

Los núcleos de todos los hongos, como el de otros organismos eucariontes, contienen un nucleolo y varios cromosomas que son limitados por una membrana nuclear. Las células de hifa en las hifas septadas pueden ser uninucleadas, binucleadas, o multinucleadas. Para la mayor parte, la división celular y nuclear son acontecimientos independientes, especialmente con respecto a crecimiento vegetativo. Como en otros organismos

eucariontes, los hongos tienen mitocondrias, ribosomas 80S, y centríolos. La pared celular de hongos consiste en la quitina, citosanina, glucanina, y otros componentes en varias combinaciones. Los hongos son heterótrofos del carbón, por lo tanto requieren compuestos orgánicos preformados como fuentes del carbón, esto hace que los hongos necesiten un sustrato orgánico para desarrollarse y crecer. La carencia de clorofila hace que los hongos presenten diferentes tonalidades a las de las plantas, a menudo blanquecinas o pardas. (Ramesh *et al*, 1999), (Gimeno, 1999).

Clásicamente los hongos se dividen en dos grandes grupos: las levaduras (Fig. 1.5) y los mohos (Fig. 1.6) mientras esta clasificación no es mutuamente exclusiva, las esporas de los mohos germinan para producir filamentos de ramificación conocidos como hifas. Las levaduras por otro lado, son formas solitarias redondeadas que se reproducen a través de los mecanismos tales como el florecimiento o la fisión formando colonias típicamente húmedas y mucoides. (Gimeno, 1991).

Destacaremos los géneros de mohos y levaduras de más interés:

MOHOS: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Monilia*, *Geotrichum*, *Gleosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Sporotrichum*, *Trichotecium*, *Absidia*, *Thamnidium*.

LEVADURAS: *Candida*, *Rhodotorula*, *Mycoderma*, *Torulopsis*.

La ciencia que tiene como objetivo el estudio de los hongos es la Micología que es una rama de la biología. (Gimeno, 1999).

Micosis es el nombre con el que se conocen a las enfermedades ocasionadas por los hongos en el hombre y en los animales. (Gimeno, 1999).

Micotoxicosis es el nombre que se da al grupo de enfermedades y trastornos originados en el hombre y en los animales, por unos metabolitos secundarios tóxicos que son producidos

por algunas especies fúngicas, estos metabolitos son llamados micotoxinas. (Gimeno, 1999).

1.3 HISTORIA Y GENERALIDADES SOBRE LAS MICOTOXINAS.

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por algunas especies fúngicas. Las micotoxinas se forman cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por estas especies fúngicas. Seguramente las micotoxinas han estado con nosotros toda nuestra existencia, ya que existen datos sobre enfermedades asociadas al consumo de alimento contaminado con hongos, tal es el caso del ergotismo que es una enfermedad asociada al consumo de alimentos contaminados con cornezuelo de centeno, que los asirios llamaban “pústula nociva de la espiga del centeno” y que provocaba que mujeres embarazadas abortaran y murieran en lecho del parto. (Gimeno, 1999), (D'Mello *et al*, 1999).

En la Edad Media también existen datos de envenenamiento por el cornezuelo del centeno. Se registraron epidemias cuyo síntoma característico era gangrena de pies, piernas, manos y brazos; se decía que las personas eran consumidos por el fuego sagrado y se ennegrecían como el carbón, por lo que la enfermedad se denominó “Fuego Sagrado” o “Fuego de San Antonio”, en honor al beato en cuyo santuario se buscaba la curación. Es probable que el alivio encontrado al viajar al santuario fuera real, pues los peregrinos no consumían centeno contaminado durante el viaje. (Gimeno, 1999), (D'Mello *et al*, 1999).

Sólo en 1815 fue posible determinar la naturaleza fúngica del parásito del cornezuelo del centeno y en 1875 se identificaron los componentes tóxicos del hongo *Claviceps purpurea*, como responsables del ergotismo. En 1940 el distrito de Orenburg antigua Unión Soviética se vio afectado por una epidemia de aleukia (leucopenia) tóxica alimentaria (ATA), enfermedad que produce leucopenia con su lógica disminución de la inmunidad y resistencia a las enfermedades. Esta misma es causada por el consumo de mijo contaminado con tricótesenos, lo que produjo numerosas muertes, llegando hasta el 10% de la población en algunas comarcas. Se identificó como responsable la toxina T-2 (tricótesenos)

producida por el hongo del género *Fusarium*. A pesar de las publicaciones de los científicos rusos describiendo la enfermedad y los hongos productores de la micotoxinas, los países occidentales no prestaron ningún interés. (Gimeno, 1999), (D'Mello *et al*, 1999).

Fue sólo en 1960 cuando una serie de circunstancias hizo cambiar la actitud adoptada frente a los hongos en los alimentos: la aparición de una enfermedad en los pavos en Inglaterra, que llevó a la muerte a 100,000 pavipollos denominada la enfermedad X (Turkey X disease). Al poco tiempo hubo brotes similares que afectaron a otras aves de corral. El origen de la enfermedad se encontró en tortas de cacahuete mezclado en el alimento, procedentes de Brasil (D'Mello *et al*, 1999).

Con una rapidez sorprendente se detectó el hongo responsable, el *Aspergillus flavus* y también fueron aislados sus metabolitos tóxicos, las aflatoxinas (acrónimo de *Aspergillus flavus* toxin). (D'Mello *et al*, 1999).

A partir de 1961, con el aislamiento de las aflatoxinas producidas por el *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus*, se evidenció la importancia de los hongos en la contaminación de los alimentos tanto humanos como animales y se ha desarrollado una exhaustiva investigación científica alrededor de las micotoxinas y todo lo relativo a ellas. (D'Mello *et al*, 1999).

1.3.1 Generalidades.

Las micotoxinas son producidas principalmente en la estructura del micelio de los hongos filamentosos y mas específicamente en los mohos, los que, como mencionamos anteriormente, son metabolitos secundarios, por lo que no tienen importancia bioquímica en el crecimiento y desarrollo de los hongos. Los hongos toxigénicos pueden producir uno o más de estos metabolitos secundarios y está bien establecido que no todos los hongos y mohos son toxigénicos y no todos los metabolitos secundarios de los hongos y mohos son tóxicos. (Gimeno, 1999), (D'Mello *et al*, 1999).

Algunos ejemplos de micotoxinas de importancia en la salud pública y en la agroeconomía son: aflatoxinas, fumonisinas, ocratoxinas tricótesenos, zeralenona, toxinas termogénicas y alcaloides del cornezuelo del centeno. Estas toxinas producen mundialmente millones de dólares en pérdidas en salud humana, salud animal y deterioro de productos agrícolas. Factores que contribuyen a la presencia y la producción de micotoxinas en alimentos humanos y animales, incluyen el almacenaje, condiciones ambientales y ecológicas. Frecuentemente la mayoría de estos factores están mas allá del control humano. (Gimeno, A. 1999), (D'Mello *et al*, 1999).

Las micotoxinas producen una respuesta toxica llamada micotoxicosis cuando son consumidas por los animales y el hombre. La ingestión de micotoxinas por el hombre y los animales que ocurre principalmente por el consumo de alimentos de origen vegetal y de residuos y metabolitos presentes en productos y subproductos animales pueden provocar deterioro de la función del hígado y del riñón, otras micotoxinas son neurotoxinas, mientras que otras actúan interfiriendo en la síntesis de proteínas, que producen: sensibilización de la piel, necrosis y inmunodeficiencia severa, otras son potentes agentes mutagénicos, teratogénicos, cancerígenos y citotóxicos (D'Mello. *et al* 1999).

Los factores que influyen en la magnitud de la toxicidad en el consumo de alimentos contaminados por micotoxinas en el hombre y los animales, incluyen: especie, raza, mecanismos o modos de acción, metabolismo y mecanismos de defensa, estos dos últimos son factores importantes para entender la toxicidad de las micotoxinas en especies específicas y en individuos separados. La especificidad de estos mecanismos queda bien demostrada en la gran diferencia de cómo manejan las micotoxinas los rumiantes y los no rumiantes, en general los rumiantes son mas resistentes a los efectos adversos de las micotoxinas, ya que en estudios invitro se ha demostrado que la microbiota del rumen tiene la capacidad de degradar a las micotoxinas. Entender las vías metabólicas de las micotoxinas en rumiantes y en no-rumiantes puede facilitar el desarrollo de soluciones para este problema. (Gimeno, 1991 y 1999), (D'Mello *et al*, 1999).

La micotoxicosis en humanos y animales se caracteriza por estar ligada a los alimentos, ser no infecciosa, no contagiosa, no transferible y no relacionada a otros microorganismos aparte de los hongos. Hasta la fecha se han descubierto cerca de 300 micotoxinas las cuales se han aislado y caracterizado químicamente, las investigaciones se ha enfocado en las formas que causan lesiones importantes en el humano y en los animales de granja y compañía, algunas de estas se incluyen en la (tabla 1.1). (Gimeno, 1999).

En general las micotoxinas se categorizan por especie fúngica, estructura y/o modo de acción, pero cabe notar que una sola especie de hongo puede producir una o muchas micotoxinas y que una micotoxina puede ser producida por diferentes especies de hongos, por ejemplo las aflatoxinas son producidas por diversas especies fúngicas, tienen diversas variaciones estructurales, y tienen diferentes modos de acción dependiendo del animal blanco. (Gimeno, A. 1999 y 1991), (D'Mello *et al*, 1999).

1.4 PRODUCCIÓN DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS.

Como mencionamos anteriormente la producción de micotoxinas por las diferentes especies fúngicas es influenciada por una variedad de factores, los que se detallan a continuación:

1.4.1 Factores Físicos.

a) Humedad y Agua disponible.

La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas. Sin embargo no sólo influye la cantidad de agua sino también la forma de presentación de la misma, así pues, el agua se encuentra en forma libre y en forma combinada. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

- El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales.

- La forma combinada está presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte integrante de las células que los componen y en unión con las proteínas y glúcidos. Para la germinación de las esporas de hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre.

b) Temperatura.

La temperatura óptima para el desarrollo de los hongos se encuentra entre 25° y 30°C y el límite máximo entre 40° y 45°C. Cabe destacar que la mayor parte de los hongos no crecen por debajo de 5°C y que sin embargo hay hongos como el *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus* y *Aspergillus fumigatus* que pueden crecer sin problemas hasta los 55°C y otros como el *Penicillium expansum* y el *Penicillium cyclopium* que son capaces de crecer a 0°C. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

c) Zonas de Microflora.

En lugares de almacenaje de los granos pueden existir pequeñas zonas del alimento con alto contenido en humedad susceptibles de desencadenar un desarrollo fúngico, lo cual puede después provocar un aumento general de humedad en el sustrato y consecuentemente una mayor contaminación fúngica y predisposición para la producción de micotoxinas. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

d) Integridad física de los granos.

Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Los granos partidos son mas susceptibles de invasión y desarrollo fúngico, que los granos enteros. Esencialmente esto es debido a un aumento de la superficie de cultivo y una mayor predisposición para que el hongo contacte con la parte interna del grano, la cual es más vulnerable que la cutícula o parte externa. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

1.4.2 Factores Químicos.

a) pH.

Los hongos toleran un gran intervalo de pH (2,5 - 7,5), de un modo general soportan mejor el medio ácido que el alcalino. Es de destacar que ellos mismos son capaces de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del alimento o los excretados por bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el periodo de deterioro del alimento. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

b) Composición del sustrato.

Los hongos no son exigentes desde el punto de vista nutricional y ellos se nutren de los micro y macro-elementos existentes en el sustrato donde se desarrollan. Sin embargo la composición del sustrato está muy ligada a la producción de la micotoxina. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

c) Nutrientes minerales.

Están relacionados con la composición del sustrato y a pesar de que el hierro y el zinc son los elementos más importantes para un desarrollo fúngico, tanto éstos como otros pueden ser necesarios para la producción de micotoxinas. Un ejemplo es el caso de la Aflatoxina, en la cual son necesarios sustratos ricos en zinc y ciertos aminoácidos para que el *Aspergillus flavus* metabolice la Aflatoxina. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

d) Potencial de oxi-reducción (O₂/CO₂).

La mayor parte de los hongos son aerobios y por lo tanto necesitan oxígeno para el desarrollo de sus reacciones metabólicas. Una carencia de oxígeno condiciona el crecimiento de los hongos y la ausencia total puede llegar a producir la muerte de éstos. El anhídrido carbónico puede inhibir la formación de algunas micotoxinas, como las

aflatoxinas. Una atmósfera con 20 a 40% de CO₂ en combinación con una temperatura reducida (17°C) o bien una humedad relativa reducida o ambos factores, previenen la formación de aflatoxina. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

1.4.3 Factores Biológicos.

a) Presencia de invertebrados

La presencia de insectos actúa como agente de diseminación de la microflora y por lo tanto contribuye al crecimiento y multiplicación de los hongos. El propio metabolismo del insecto eleva el contenido de humedad del sustrato y además la rotura del pericarpio permite la infección del interior del grano. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

b) Estirpes específicas.

En una misma especie fúngica, no todas las estirpes se comportan de la misma forma. Así pues, la estirpe NRRL 1957 de *Aspergillus flavus* no produce aflatoxina, sin embargo ella es producida por otras estirpes como: NRRL 3251, NRRL 3357, NRRL 3517 y NRRL 3353. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

1.4.4 Tipos ecológicos de hongos.

Existen varios tipos ecológicos de hongos que afectan a los alimentos en diferente etapa de su procesamiento, lo que quiere decir que se desarrollan en diferentes etapas del proceso de producción, Esto es de gran importancia ya que podemos saber o sospechar que especie fúngica está atacando nuestro producto y además en que etapa del proceso de producción es en la que se contaminó. (Gimeno, 1991 y 1999).

Existen tres tipos de microbiota contaminante de alimentos. La microbiota de campo, la intermedia y la de almacenamiento.

En la (tabla 1.2) citamos los tres tipos de micobiota y algunos factores que están correlacionados con cada una de ellas.

1.4.5 Relación hongo-micotoxina.

En los alimentos contaminados por hongos la presencia de éstos no implica la producción de la micotoxina ya que además de la capacidad genética del hongo es necesario que ciertos condicionantes sean satisfechos para que el hongo produzca micotoxina. También puede ocurrir el hecho de detectar la micotoxina sin la presencia del hongo productor, puesto que las formas vegetativas y germinativas del moho pueden ser inactivadas por procesos químicos o por alteración de los factores ecológicos, no ocurriendo lo mismo con las micotoxinas, que permanecen en el sustrato. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

1.5 CONTAMINACIÓN POR MICOTOXINAS DE ALIMENTOS COMPUESTOS PARA ANIMALES.

En la producción animal actual para obtener productos animales de mayor calidad en menor tiempo y con un costo menor, se hace uso de la nutrición en la cual se formulan dietas más eficientes, las cuales se producen con una gran cantidad de ingredientes los que pueden ser de diferente origen, que va desde cereales como el maíz, el sorgo, la cebada, la avena y el mijo, hasta subproductos industriales como las pastas de oleaginosas y harinas de carne, sangre y pluma. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

Esta diversidad de ingredientes conlleva el problema de incluir en las dietas ingredientes contaminados con micotoxinas, sin embargo cabe mencionar que aun después de ser elaborado el producto o alimento compuesto, éste también es susceptible a esta contaminación, por lo que un alimento compuesto puede sufrir una contaminación fúngica y de micotoxinas por varias razones y en diferentes lugares, por lo que la contaminación se puede presentar en las siguientes partes del proceso. A saber: (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

1.- Contaminación de origen externo:

La utilización de alguna o algunas materias primas contaminadas, podrán contaminar los piensos en los que intervengan y a la vez las instalaciones de la fábrica. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

2.- Contaminación en el interior de la fábrica:

En la fábrica de alimentos compuestos y a lo largo del proceso de elaboración, el polvo de las materias primas y de los alimentos, se queda adherido a las paredes de los silos, transportadores, elevadores, tolvas, mezcladores, interior de las canalizaciones y en especial los recodos y curvaturas de éstas. Este polvo puede proceder de materias primas contaminadas en mayor o menor grado y por una falta de limpieza y desinfección periódica o bien porque algunas partes de la instalación de la fábrica son muy difíciles de limpiar, este polvo se queda allí adherido durante mucho tiempo. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

En condiciones de humedad y temperatura adecuadas, el crecimiento de hongos y la posible producción de micotoxinas pueden tener lugar en el polvo acumulado diariamente dando lugar a un proceso de contaminación crónico que afecta a la calidad de las materias primas que pasan diariamente por estos focos contaminados. Repercutiendo todo ello en la calidad y conservación del alimento final. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

3.- Contaminación fuera de la fábrica:

Un alimento puede estar en perfectas condiciones a la salida de la fábrica, sin embargo se puede contaminar durante el transporte (focos de contaminación dentro de las cubas a granel) o bien, estropearse en la propia granja por problemas de residuos contaminados en el interior de los silos o infiltraciones y condensación de agua dentro de los mismos, así

como por falta de higiene en los comederos y otras zonas de la explotación. (Gimeno, 1999), (Ramesh *et al*, 1999).

1.6 MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN DE LA PRESENCIA DE MICOTOXINAS EN ALIMENTOS.

Desde que las micotoxinas fueron reconocidas como una amenaza potencial para la salud humana y animal a principios de los 60's y que resultan frecuentemente en pérdidas económicas, el desarrollo de métodos para su detección se ha constituido en una importante demanda. (Gimeno, 1999), (D'Mello *et al*, 1999). En los últimos 15 años las técnicas aplicadas para la detección, análisis y caracterización de las micotoxinas se han diversificado, sin embargo existen métodos altamente probados y estandarizados para estos fines, por lo cual podemos clasificarlos principalmente en:

- Métodos basados en HPLC (High Performance Liquid Chromatography).
- Métodos basados en ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
- Métodos basados en Cromatografía de columnas de inmovilización.

Todos estos métodos tienen diferentes grados de detección y cuantificación, dependiendo principalmente del tipo de alimento a analizar y el tipo de micotoxina a encontrar. Sin embargo cada uno de ellos tiene ventajas y desventajas.

1.6.1 Métodos basados en HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Pocos métodos de análisis químico son verdaderamente específicos a un analito particular. Se encuentra a menudo que el analito del interés se debe separar de la miríada de los compuestos individuales que pueden estar presentes en una muestra. Así como proveer del científico analítico métodos de separación; las técnicas cromatográficas pueden también proporcionar métodos de análisis. La cromatografía implica una muestra (o el extracto de muestra) que es disuelto en una fase móvil (que pueda ser un gas, un líquido o un líquido

supercrítico). La fase móvil entonces se fuerza con una fase inmóvil e inmiscible. (Kromidas, 2006).

Las fases se eligen tales que los componentes de la muestra tienen solubilidades que se diferencian en cada fase. Un componente que es absolutamente soluble en la fase inmóvil llevará un recorrido más largo a través de ella que un componente que no sea muy soluble en la fase inmóvil sino muy soluble en la fase móvil. Como resultado de estas diferencias en movilidades, los componentes de la muestra se separarán de uno a uno, por que viajan por la fase inmóvil. Técnicas tales como columnas de uso de H.P.L.C. (cromatografía líquida del alto rendimiento), se usan tubos estrechos con la fase inmóvil, con la cual la fase móvil es forzada a pasar por ellos. La muestra es transportada a través de la columna por la adición continua de la fase móvil. Este proceso se llama elusión. Se determina la tasa media en la cual un analito se mueve a través de la columna para el momento en que pase en la fase móvil y las diferencias de tiempo calculan y determinan el tipo de componente que se encuentra en la fase móvil. Por este proceso se puede analizar tanto la presencia de varios analitos en nuestro caso micotoxinas y por cálculos en los picos de la gráfica podemos determinar la cantidad de estos compuestos en la muestra. (Kromidas, 2006), (Chu, 1992).

Las desventajas principales de este método radican en el alto costo del equipo utilizado, sin embargo los reactivos usados no son tan costosos como en otras técnicas.

La ventaja principal de esta técnica es que es muy exacta para saber las diferentes micotoxinas presentes en la muestra. Y también tiene buen grado de sensibilidad para cuantificar cada componente.

1.6.2 Métodos basados en ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Debido que las micotoxinas no son antigénicas, los primeros estudios que se desarrollaron fueron en el sentido de lograr la conjugación con proteínas o polipéptidos que pudieran servir como transportadores en las condiciones óptimas de producción de anticuerpos en conejos y en otros animales. Con los avances en la tecnología se han logrado producir anticuerpos monoclonales contra diversas micotoxinas. (Lawellin, 1977), (Chu, 1992).

Con estos avances se han logrado diseñar ensayos inmunológicos para la determinación de micotoxinas, tanto en métodos de ELISA como en columnas de inmuoafinidad.

En general dos sistemas de ELISA se han usado para el análisis de micotoxinas y ambos son ensayos competitivos heterogéneos. Un sistema es ELISA directo, se utiliza un conjugado enzima-micotoxina y el otro sistema es ELISA indirecto, dado que se utiliza un conjugado proteína-micotoxina y un anticuerpo secundario con el cual una enzima ha sido conjugada. Generalmente la peroxidasa de “horseradish” es la enzima más comunmente utilizada para conjugación, otras enzimas que también se utilizan son la fosfatasa alcalina y la β -galactosidasa. En el ensayo competitivo directo, los anticuerpos se inmovilizan en una fase sólida, esferas o tubos de poliestireno, esferas de nylon o tarjetas material plástico, o bien placas para microtitulación. (Lawellin, 1977). La muestra en solución o el estándar de toxina es generalmente incubada simultáneamente con el conjugado enzimático. Después de los lavados apropiados, la cantidad de enzima conjugada que reacciona con el anticuerpo se determina por incubación con un sustrato en solución que contiene peróxido de hidrógeno que actúa como un oxidante cromógeno. El color resultante se mide ya sea visualmente o por medio de un espectrofotómetro. En este ensayo, las toxinas presentes en el extracto de la muestra y los conjugados enzimáticos de las toxinas compiten por los mismos sitios de enlace presentes en el anticuerpo inmovilizado en la superficie sólida. Debido a que las concentraciones de conjugado enzimático y de anticuerpo son constantes, la intensidad del color es un función inversamente proporcional a la concentración de toxina. (Haugen *et al*, 1981), (Lawellin, 1977).

En el ensayo ELISA indirecto un conjugado formado por la micotoxina enlazada a una proteína o un polipéptido se inmoviliza en una placa de microtitulación. La placa se incuba con el anticuerpo específico en presencia de las micotoxinas homólogas. La cantidad de anticuerpo enlazado al conjugado proteínico inmovilizado en la placa es determinado después por la reacción con un complejo enzimático IgG y por la subsiguiente reacción con el sustrato. Así la toxina en las muestras y la toxina en la fase sólida compiten con los mismos sitios de unión con el anticuerpo específico en solución. (Lawellin, 1977)

1.6.3 Métodos basados en Cromatografía de columnas de inmunoafinidad.

Los métodos de columnas de inmunoafinidad se han popularizado enormemente en los últimos años, por su sencillez de uso y por su aceptable exactitud en la detección; otro factor a su favor es que son métodos que no utilizan equipo de laboratorio especializado y el precio por análisis en los últimos años tiende a la baja.

En estos procedimientos los anticuerpos monoclonales específicos para una micotoxina en particular, se inmovilizan formando un gel, que se empaca en una columna. Cuando el extracto de un insumo o de un alimento terminado se hace pasar a través de la columna, la micotoxina queda combinada con los sitios de unión del anticuerpo, mientras que el resto de los componentes del extracto no se combinan, después de esto se procede a eliminar cualquier compuesto que haya quedado retenido con una serie de lavados, posteriormente se eluye la micotoxina con una solución metanólica. La solución resultante se pasa a través de un sistema por cromatografía de líquidos o bien se derivatiza y se lee en un fluorómetro especialmente diseñado. (OMA, 1999), (Gimeno, 1999), (Chu, 1992).

1.7 EL GÉNERO ASPERGILLUS.

1.7.1 Clasificación Taxonómica.

Descrito por Micheli ex Link en 1809

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Orden: *Eurotiales*

Familia: *Trichocomaceae*

Género: *Aspergillus*

1.7.2 Descripción y habitad natural.

El *Aspergillus* es un hongo filamentoso, cosmopolita y ubicuo encontrado en la naturaleza. Se aísla comúnmente de suelo, de la raíz de las plantas, y del aire ambiental interior. Mientras que el género teleomórfico se ha descrito solamente para algunos *Aspergillus*, otros son aceptados como mitospóricos, sin ninguna producción de espora sexual conocida. (Raper *et al*, 1965), (De Hoog *et al*, 2000).

El género *Aspergillus* incluye más de 185 especies. Alrededor de 20 hasta ahora se han reportado como agentes causales de infecciones oportunistas en el hombre y los animales. (De Hoog *et al*, 2000).

De estas especies *Aspergillus fumigatus* es la especie más aislada, seguida de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*. *Aspergillus clavatus*, *Aspergillus glaucus group*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus ustus*, and *Aspergillus versicolor* son especies menos comúnmente aisladas.

Otro aspecto muy importante de este género es la capacidad para infectar tejidos vegetales y la producción de micotoxinas. (Moreno, 1996).

1.7.3 Producción de Micotoxinas por Aspergillus flavus.

Como anteriormente mencionamos, las micotoxinas son metabolitos secundarios resultantes de la oxidación de algunos ácidos grasos. Para entender claramente su producción tenemos que acercarnos a las teorías de los metabolitos en los procesos celulares.

Los metabolitos en los procesos celulares se pueden dividir convenientemente en primarios o secundarios basados en su esenciabilidad para la vida. (Moreno, 1996).

Los metabolitos primarios como productos fundamentales en las vías del carbón y el nitrógeno; están involucrados en la síntesis de componentes esenciales para la vida como azúcares, aminoácidos y lípidos. (Moreno, 1996).

En contraste, los metabolitos secundarios por su amplitud de características los científicos por mucho tiempo no han podido ponerse de acuerdo en una definición, sin embargo se ha llegado a aceptar la definición de *Aharonovitz, Demain y Bu'lock*, que restringe el término a “Sustancias producidas no requeridas para el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de un organismo vivo” sin embargo esta definición es muy limitante ya que estas sustancias están ligadas a muchos procesos metabólicos y es necesario establecer una línea de investigación tanto en los aspectos genéticos, como metabólicos para cada organismo. (Moreno, 1996).

El punto principal del estudio de los metabolitos secundarios es conocer su habilidad para ejercer efectos en componentes específicos y la interacción de estos componentes en sistemas biológicos y celulares, como es el caso de las micotoxinas y específicamente las aflatoxinas que son producidas por *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare. Las principales aflatoxinas son cuatro: AFB1, AFB2, AFG1 y AFG2.

Generalmente AFB1 es encontrada en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, siendo carcinógena, teratógena y mutágena (Moreno, 1996).

*1.7.4 Las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*.*

Químicamente, las aflatoxinas son difuranocumarinas (Buchi y Rae, 1969). Estos compuestos están formados por anillos heterocíclicos, los furanos relacionados a la toxicidad y un anillo de lactona responsable de la fluorescencia y el cual también hace que estos metabolitos sean susceptibles a la hidrólisis alcalina (Lillehoj, 1983). Las letras B y G se refieren a los colores azul y verde de fluorescencia observados bajo luz ultravioleta de onda larga; esta propiedad de fluorescencia de las aflatoxinas ha llegado a ser la base para la cuantificación por métodos fisicoquímicos antes mencionados (Asao *et al*, 1963); y los números se refieren a los patrones de separación de estos compuestos al utilizar cromatografía de capa fina (Bullerman, 1979). En la Figura 1.7 se muestran las estructuras moleculares de algunas aflatoxinas.

Las aflatoxinas se generan por la vía biosintética de los poliquétidos a partir de acetatos y se consideran los contaminantes biológicos de los alimentos más extendidos a nivel mundial y los más peligrosos que se conocen debido a sus propiedades cancerígenas, mutágenas y teratógenas (Jelinek *et al*, 1989). No se conoce el papel fisiológico del metabolito en el desarrollo del hongo. Sin embargo, se ha establecido que existe una estrecha asociación entre la biosíntesis de aflatoxinas y la de los lípidos (Townsend *et al*, 1984), (Cleveland y Bhatnagar, 1991) y que además en algunos casos, la síntesis de proteínas disminuye durante la fase de producción de aflatoxinas (Maggon *et al*, 1977). Al crecer inicialmente el hongo existe muy poca o ninguna producción de aflatoxinas, pero al reducirse los niveles de fosfatos y nitrógeno en el medio, el metabolismo primario se desorganiza, se acumulan varios metabolitos primarios y se empiezan a producir las aflatoxinas (Drew y Demian, 1987). Aún cuando su papel ecológico no está bien comprendido, al ser sus estructuras de resistencia (esclerocios) repelentes a ser ingeridos por insectos, se refiere que tienen un papel defensivo (Wicklów, 1988), (Dowd, 1991).

Existen cepas en las que no existe la producción de estas toxinas, por lo que se asume que estos metabolitos no son esenciales para su desarrollo. La producción de aflatoxinas depende de varios factores: la cepa del hongo; el substrato; el contenido de humedad; la temperatura y la micoflora asociada. Las aflatoxinas son producidas sólo por algunas cepas denominadas toxígenas, cuyos requerimientos son especiales para su desarrollo, por ejemplo: una actividad de agua mínima de 0.85, equivalente a 16.5% de humedad en cereales como el maíz, en cuanto al límite de humedad máximo, prácticamente no existe; puesto que en los laboratorios se pueden producir aflatoxinas aún en medio líquido, siempre y cuando sean cultivos puros. (Drew y Demian, 1987).

En cuanto a la temperatura mínima para la producción de aflatoxinas es de 12°C, la óptima de 27-30°C y la máxima de 40-42°C. *Aspergillus flavus* crece lentamente a temperaturas menores de 12°C, y rápidamente a temperaturas hasta de 55°C; pero no produce aflatoxinas debajo de 12°C, ni arriba de 40-42°C (Diener y Davis, 1966).

1.7.5 Las aflatoxinas su absorción, biotransformación y toxicidad.

En cuanto a su importancia, se sabe que prácticamente todos los seres vivos son susceptibles a las aflatoxinas. *Aspergillus flavus* está adaptado a emplear un amplio espectro de fuentes orgánicas. Además de ser saprofito, es un organismo patógeno oportunista en plantas, insectos y vertebrados incluyendo al hombre y animales domésticos (Bhatnagar *et al*, 1994). Sus efectos pueden ser agudos o crónicos dependiendo del organismo afectado, la dosis y frecuencia de exposición.

La sensibilidad varía con las especies, edad y sexo en los animales, así como la composición de la dieta y la ruta de ingestión (Krishna y Sinha, 1991).

Para que las aflatoxinas puedan causar daño es necesario que ocurra absorción, distribución, biotransformación y la acumulación residual dentro de un organismo (animal o humano). De todas las aflatoxinas la AFB1 se considera la más tóxica y en orden decreciente le siguen: AFG1, AFB2, AFG2, AFM1 y AFQ1 (Betina, 1989).

Absorción.

El principal sitio de absorción es el aparato digestivo seguido de pulmón y de la piel y esto se debe a que las aflatoxinas son compuestos liposolubles (Sawhney *et al*, 1973), (Klaassen y Rozman, 1990) por lo que fácilmente son absorbidas, para posteriormente llegar al torrente circulatorio y de ahí distribuirse hacia los tejidos blandos y depósitos de grasa en los pollos; sin embargo la mayor acumulación ocurre en los órganos involucrados en la biotransformación y eliminación de los alimentos, como son el hígado y el riñón, esto fue observado por Sawhney *et al* (1973), quienes administraron aflatoxina marcada con carbono 14 en dosis única, detectando pocos minutos después de la toma la presencia en hígado y riñón principalmente, así como en otros tejidos (músculo, tejido adiposo y piel).

Por otro lado, está demostrado que la absorción de AFB1 a nivel del intestino delgado es mediante difusión pasiva y dependiente de la composición lipídica del epitelio intestinal, sin perder de vista que en el tracto gastrointestinal puede llevarse a cabo una biotransformación, generando AFB1-epóxido, dihidrodiol-AFB1 o AFB2 capaces de interactuar con proteínas intestinales (Hsieh y Wong, 1994).

Biotransformación.

En general, la biotransformación es una reacción enzimática consistente en una oxidación, reducción, hidrólisis y conjugación con diferentes sustancias que se lleva a cabo principalmente en el hígado por la enzima citocromo P450 mitocondrial en un metabolito hidrosoluble, dando origen a la aflatoxina M1, Q1, P1 y Ro (Figura 1.8). Otra enzima que también se ha visto involucrada es el citocromo 488 (Yoshisawa *et al*, 1982). Sin embargo, también puede realizarse en otros tejidos u órganos como el riñón, los pulmones, la placenta e incluso en sangre. Cabe mencionar que es probable que existan otras reacciones de biotransformación en las cuales intervienen enzimas no microsomales (Shank, 1981), como es el caso del aflatoxicol que a diferencia de los anteriores no se origina de la acción de enzimas microsomales, si no de enzimas localizadas en el citosol.

La presencia de aductos AFB1-albúmina en sangre, es indicativo que la toxina fue metabolizada hasta epóxido ya sea en el lumen del intestino, en la pared de éste o en sangre

y su presencia es usada como biomarcador de exposición a AFB1 (Dalezios *et al*, 1973), (Luthy *et al*, 1980), (Hsieh y Wong, 1994). En tanto, la conversión de AFB1 a aflatoxicol se lleva a cabo mediante una reductasa citosólica. El aflatoxicol es considerado tan tóxico y carcinogénico como la AFB1 aunque su mutagenicidad es sólo del 70% de ésta. De acuerdo con ello Wong y Hsieh (1980), propusieron la hipótesis de que el aflatoxicol puede permanecer como “reservorio” de AFB1 *in vivo*. Aunado a esto (Patterson and Roberts, 1970) postularon que si el aflatoxicol sufre una re-oxidación por la enzima deshidrogenasa microsomal adquiere nuevamente su conformación de AFB1 confirmando la hipótesis de que puede permanecer como reservorio.

Desde el punto de vista bioquímico, las aflatoxinas son consideradas como inhibidores biosintéticos y en el caso de la AFB1 se ha encontrado que su actividad biológica tiene varias fases: 1) interacción con el ADN e inhibición de las polimerasas responsables de la síntesis tanto de ADN como ARN; 2) Supresión de la síntesis del ADN; 3) Reducción de la síntesis del ARN e inhibición del ARN mensajero; 4) alteraciones en la morfología del nucleolo y 5) reducción de la síntesis de proteínas (Clifford y Rees, 1966).

Bioquímicamente, las aflatoxinas pueden alterar el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, así como el metabolismo energético. Las aflatoxinas pueden ser consideradas como inhibidores biosintéticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Altas dosis pueden provocar una inhibición total de los sistemas bioquímicos, y dosis bajas pueden afectar diferentes sistemas metabólicos (Ellis *et al*, 1991).

Diversos estudios han demostrado que los niveles de glucógeno hepático se reducen por la acción de las aflatoxinas, lo que puede deberse al efecto sobre la inhibición de la glucogénesis, la disminución en el transporte de glucosa hacia las células hepáticas y la aceleración de la glucogenólisis. Sin embargo, tanto la síntesis de lípidos como el transporte a través de las células son incrementados (Ellis *et al*, 1991).

En contraste con la mayoría de las micotoxinas, la AFB1 no es un carcinógeno *per se*, pero requiere de una biotransformación para ejercer su acción. La interacción de las aflatoxinas

con los ácidos nucleicos es de dos tipos: uno de ellos es a través de uniones no covalentes, las cuales son débiles y reversibles; el otro tipo es con uniones covalentes formando enlaces muy fuertes e irreversibles, permitiendo la formación de complejos DNA-Aflatoxina conocidos como “aductos” (Kiessling, 1986). Estos aductos son el resultado de la acción enzimática del P450, por lo que hace a las células hepáticas las más susceptibles por su alto contenido de esta enzima.

La unión de la aflatoxina al ADN (aducto) se da en varios pasos:

1) Intercalamiento de la toxina en la estructura helicoidal del ADN; 2) Oxidación de los carbonos no saturados (C8 y C9) de la parte terminal furano de la molécula de AFB1 por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta (organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unidas al citocromo P-450) para formar un intermediario y 3) El ataque del C8 de AFB1 sobre el N7 de la guanina y la formación de una ligadura covalente en la interacción AFB1- N7- Guanina. El daño en la molécula de ADN por esta interacción se manifiesta de varias maneras; el aducto es cortado de la molécula de ADN y se inducen errores en el mensaje o bien, el aducto no es cortado pero es convertido en AFB1-formamidopirimidina que también es causante de errores en la transcripción. Como consecuencia en el daño del ADN se origina la mutagénesis y carcinogénesis y si se trata de un feto se presenta la teratogénesis (Eaton *et al*, 1994).

Además de la inhibición de la replicación del ADN, de la síntesis de ARN y proteínas, la AFB1 origina un efecto en las membranas del retículo endoplásmico y en la fosforilación oxidativa interfiriendo en la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente en los citocromos b y c. El metabolismo de los carbohidratos también se ve afectado, inhibe la síntesis de glicógeno a través de la acción sobre las enzimas glicógeno sintetasa y transglicosilasa. Otro de los problemas que ocasionan las aflatoxinas es el de incrementar el nivel citosólico del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos, por lo que se produce una acumulación de lípidos en el hígado (Betina, 1989).

Las primeras lesiones observables de aflatoxicosis son la necrosis hepática y cambios degenerativos grasos. En general, se considera que las aflatoxinas actúan como un antimetabolito que se une al ADN e interfiere en la biosíntesis del ARN y proteínas.

Para ser eliminadas a través de la leche, secreciones digestivas y urinarias, las aflatoxinas de manera general se conjugan con ácido glucorónico y taurocólico los cuales conforman a la bilis y en menor grado estas son eliminadas a través de riñón y aparato gastrointestinal. Trabajos realizados por Sawhney *et al.* (1973) observaron en gallinas y pollos de engorda que al dar una dosis única por vía oral y parenteral de aflatoxina marcada, el 28% de ella se eliminaba por vía urinaria y gastrointestinal en las primeras 24 hrs, y el 71% se excretaba después de 7 días, la vida media en el plasma fue de 1.5 hrs. para aparecer rápidamente en bilis. Por lo que se menciona que se puede eliminar de los tejidos en un tiempo relativamente corto entre 72 y 96 hrs. posingestión.

Toxicidad.

La aflatoxina B1 está clasificada como la más tóxica (LD50 1-50 mg/kg) para muchas especies animales. Las especies más susceptibles a AFB1 son los patos, conejos y gatos mientras que los ratones, hámster, ratas y pollos son más resistentes. Con respecto a las especies aviares los patos son los más sensibles seguidos de los pavos, gansos, faisanes, pollos de engorda y gallinas (Muller *et al.*, 1970).

El efecto tóxico de las aflatoxinas depende de la dosis y del tiempo de exposición, por lo que se puede distinguir procesos de curso agudo caracterizados por hemorragias severas, anorexia, depresión y muerte (Osweiller *et al.*, 1985) o bien desarrollar cuadros de curso crónico, donde se presenta una disminución en la ganancia de peso, mala conversión alimenticia, inmunodepresión e incluso desarrollo de procesos neoplásicos principalmente en hígado (Smith and Ross, 1991).

Respecto al efecto residual no se tienen evidencias que la AFM1 se elimina a través del huevo; Sawhney *et al.* (1973) y Jacobson and Wiseman (1974) encontraron diferentes niveles de aflatoxina (entre 0.2 y 3.3 ppb) en los diversos componentes del huevo

(cascarón, yema y clara) al dar dietas con 100 a 400 ppb de AFB1. Trucksess *et al.* (1983) alimentaron gallinas de postura con alimento que contenía 8,000 ppb de AFB1 durante 7 días, sacrificando a la mitad de las aves al término de este periodo. Al resto de las aves se les alimentó 7 días más con un producto libre de AFB1. Ellos observaron la presencia de AFB1 y aflatoxicol en huevo y tejidos blandos (hígado y ovario) y AFM1 en riñón a los 7 días postconsumo de alimento contaminado.

1.7.6 Aflatoxicosis en pollos.

Antecedentes.

Las aflatoxinas han sido responsables o han estado involucradas en diferentes síndromes en aves, por ejemplo en la enfermedad “X” de los pavos en el Reino Unido descrita por Blount en 1961, la cual se caracterizó por alta mortalidad, aproximadamente 100,000 pavos. Donde se realizaron esfuerzos para encontrar a un agente infeccioso, siendo estos análisis negativos al aislamiento biológico, sin embargo mediante un proceso de pruebas alimentarias se encontró una sustancia tóxica asociada con un ingrediente de la dieta, pasta de cacahuete de Brasil. También se ha relacionado con el síndrome de hígado graso y síndrome de hígado hemorrágico en aves (Kubena *et al.*, 1990).

La aflatoxicosis altera los parámetros productivos tales como ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia, pigmentación, producción de huevo y rendimiento productivo de hembras y machos, además de su efecto inmunodepresor y cancerígeno tanto en animales como en el hombre. Algunas de estas alteraciones son influenciadas directamente por la intoxicación, aunque otras son indirectas, causadas generalmente por reducción en el consumo de alimento.

Dosis.

En general para la intoxicación con aflatoxina es importante considerar el tipo de aflatoxina, la dosis, el tiempo de exposición, especie animal, sexo, estirpe o raza y la edad del animal expuesto. Sin embargo a pesar de las consideraciones anteriores y de años de estudio, se tienen amplios rangos de niveles necesarios para causar alteraciones en los parámetros productivos y reproductivos, manifestaciones clínicas de intoxicación y

alteraciones morfológicas. Por este motivo mencionaremos algunos autores que han realizado trabajos de investigación enfocados principalmente al efecto de la aflatoxina B1. Los diferentes trabajos que se han realizado resumen las siguientes dosis, efectos, tiempos y alteraciones:

En pollos de engorda con edades de 1 a 7 días con un tiempo de consumo de 7 a 14 días con dosis de 300 a 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo, se encontraron lesiones hepáticas y muerte. (Bababunmi y Bassir 1982),(Muller *et al*, 1970), también en pollo de engorda de un día de edad con tiempo de consumo de 7 semanas a dosis de 75 a 675 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo, se encontró retraso en el crecimiento en la dosis baja y aumento en la mortalidad en la dosis alta, a dosis de 250 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo por 3 semanas hubo reducción en la ganancia de peso, lesión hepática e inmunosupresión, con dosis de alrededor de los 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo por 29 días se observó un aumento de la susceptibilidad a la coccidiosis, y por un lapso de 10 semanas a dosis de 200 a 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo retraso en el crecimiento en la dosis baja y lesión hepática grave y aumento en la mortalidad en la dosis alta. (Smith and Hamilton., 1970), (Doerr *et al*, 1983), (Giambrone *et al*, 1985), (Edds *et al*, 1973), (Ghosh *et al*, 1990).

En pavos de 14 días de edad con tiempo de consumo de 35 días a dosis de entre 100 y 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo, se encontraron reducción en la ganancia de peso y lesión hepática microscópica y en pavitos a dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo, se encontró reducción de la eficiencia a la vacunación de Marek. (Edds, 1973), (Giambrone *et al*, 1985), (Quist *et al*, 2000).

En cuanto a gallinas de postura alimentadas con AFB1 en el alimento con dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo por un periodo de 6 semanas, se encontraron alteraciones en el contenido del calcio en el cascarón y con dosis de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso vivo por un lapso de 33 semanas hubo reducción en la producción de huevo y aumento de la mortalidad. (Smith and Hamilton, 1970),(Bayman and Cotty, 1993).

Signos clínicos.

Los signos clínicos en intoxicación aguda generalmente cursan con la muerte de los animales de forma repentina. En los casos de intoxicación crónica (dosis bajas por un periodo largo) se pueden observar los siguientes:

En pollos de engorda con una dosis de 4 ppm de AFB1 se describe pérdida de peso, retardo del crecimiento, elevación de la mortalidad, disminución de peso y aumento de la conversión alimenticia. Sin embargo este mismo efecto se observa cuando la dieta contiene 0.5 ppm de AFB1 durante cuatro semanas (Rao and Joshi 1993), (Osborne *et al*, 1982), (DaFalla *et al*, 1987), (Del Río, 1998) e inmunodepresión (infecciones bacterianas y parasitarias secundarias) (Ghosh *et al*, 1990), (Virdi *et al*, 1989) disminución en el número de huevos por ciclo, fragilidad del cascarón por cambios en el contenido de calcio. Diversos autores coinciden que los signos comienzan a aparecer entre la 2a y 3era semana de ingesta del alimento contaminado (Newberne, 1973).

Tyczkowski and Hamilton (1987) y Schaeffer *et al* (1988) observaron aves pálidas, con pobre pigmentación, atribuyendo este hecho a una disminución en la absorción, transporte y depósito de los carotenos de la dieta en los tejidos. En gallinas ponedoras se presenta disminución en la producción y peso del huevo con 1 ppm de AFB1, al ingerir alimento contaminado durante 4 semanas.

Alteraciones observadas en pruebas de laboratorio.

Hematología y química sanguínea:

En pavos se ha observado disminución en la cuenta de eritrocitos, con un hematocrito de alrededor del 25 % (normal del 27%) en machos reproductores. Además las aflatoxinas son causa del aumento de la cuenta leucocitaria de heterófilos y monocitos, con linfopenia patente (Tung *et al*, 1975).

Los niveles normales de proteína sérica en aves son entre 3.0 y 6.0 g/dl, observaron una disminución del 43% en la concentración de proteínas plasmáticas al administrarse 2.2 g/kg de peso vivo. También describen una disminución del 64% de colesterol sanguíneo (normal 100 y 200 mg/100ml), además Doerr *et al* (1976) describieron una disminución de proteínas específicas que actúan en la coagulación, con aumento en el tiempo de coagulación.

Los niveles de colesterol, triglicéridos, calcio, fósforo, así como la actividad enzimática de la Aspartato Aminotransferasa (AST), Alanino Aminotransferasa (ALT), Lactato Deshidrogenasa (LDH) y Gamma Glutamilttransferasa (GGT) se ven afectados al utilizar dosis de 0.5 ppm, 2.5 y 5 ppm de AFB1 (Fernandez *et al*, 1994), (Arshad *et al*, 1993), (Kumar *et al*, 1993), (Quezada *et al*, 1993), (DaFalla *et al*, 1987).

La actividad de los leucocitos y la respuesta inmune también se ven afectadas por la presencia de aflatoxinas. El mecanismo exacto es desconocido, sin embargo el efecto negativo sobre el complemento, interferón, proteínas séricas y actividad leucocitaria son presumiblemente resultado de la lesión hepática y de la inhibición de la síntesis de proteínas (Pier and McLoughlin, 1985).

Corrier (1991) menciona que con un consumo de dietas con 0.2 a 0.5 ppm de aflatoxina la respuesta inmune contra *Pasteurella multocida*, *Salmonella pullorum* y contra el virus de NewCastle no se ve alterada, no así cuando los niveles son entre 0.6 a 10 ppm. Sin embargo otros autores como Edds *et al* (1973) y Batra *et al* (1991) sí observaron disminución de la respuesta inmune al utilizar las dosis bajas mencionadas.

Alteraciones morfopatológicas.

El hígado es el principal órgano afectado, aun cuando otros órganos y tejidos muestran también alteraciones anatómicas.

Hígado: se observa decoloración pálida amarilla-verdosa y con el tiempo desarrolla focos blanquecinos, hemorragias petequiales o equimóticas, en ocasiones hematomas. El hígado

puede estar aumentado de tamaño (curso agudo) o atrofiado (crónico) con fibrosis abundante. Histológicamente los hepatocitos presentan degeneración grasa, hay hiperplasia de conductos biliares, fibrosis perilobulillar y focos de necrosis; además se observa la presencia de células inflamatorias como heterófilos y mononucleares en espacio porta.

Riñón: también se observa con tonalidades pálidas blanquecinas o amarillentas, difusas, correspondientes a necrosis tubular o degeneración grasa, se describe también la presencia de infiltración linfoide.

Otros: se ha descrito cardiomegalia, atrofia de bolsa de Fabricio, timo y bazo con depleción linfoide, otros hallazgos son atrofia de médula ósea observándose de color blanquecino y hemorragias en masas musculares (petequias y equimosis) (Newberne, 1973), (Virdi *et al*, 1989), (Ghosh *et al*, 1990), (Espada *et al*, 1992), (Arshad *et al*, 1993), (Kumar *et al*, 1993), (Quezada *et al*, 1993), (Quist *et al*, 2000).

1.8 EL GÉNERO *FUSARIUM*.

1.8.1 Clasificación Taxonómica.

Descrito por Link ex Gray en 1821

Reino: *Fungi*

Phylum: *Ascomycota*

Orden: *Hypocreales*

Familia: *Hypocreaceae*

Género: *Fusarium*

1.8.2 Descripción y habitat natural.

Fusarium es un hongo filamentoso distribuido extensamente en las plantas y en el suelo. Se encuentra en el micoflora normal de piensos, tales como arroz, haba, soja y otras cosechas (Pitt *et al*, 1994).

Mientras que la mayoría de las especies son más comunes en las áreas tropicales y subtropicales, algunas habitan en suelo en climas fríos. Algunas especies de *Fusarium* tienen un estado teleomófico (Larone, 1995), (Sutton *et al*, 1998).

Así como ser un contaminante común y un patógeno bien conocido de plantas con la capacidad de producir micotoxinas (De Hoog *et al*, 2000).

El género *Fusarium* contiene actualmente unas 20 especies. Unas de los más comunes de éstas son *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium chlamydosporum*

1.8.3 Producción de Micotoxinas por Fusarium moniliforme.

Los hongos del género *Fusarium* sp están reconocidos mundialmente, ya que son capaces, dependiendo de la especie, de metabolizar una serie de toxinas de diversa estructura química. Muchas de las especies toxigénicas de *Fusarium* son descritas como las mayores

patógenas para plantas y cereales, causando por ejemplo “podredumbre de la mazorca de maíz”, así como un producto utilizado para la alimentación animal (Placinta *et al*, 1999).

De las más importantes desde el punto de vista de salud animal y productividad están los tricotecenos, zearalenonas, moniliformina y fumonisina (Chulze *et al*, 1996), (Viquez *et al*, 1996), (D Mello *et al*, 1999).

Este trabajo se basa principalmente en las toxinas producidas por *Fusarium moniliforme* y *Fusarium proliferatum* que son principalmente la fumonisina. Estos dos géneros figuran entre los hongos más comúnmente asociados con el maíz y que pueden recuperarse de la mayoría de los granos, incluso de los que parecen sanos. La presencia de fumonisinas en las plantaciones de maíz en el campo, guardan una correlación positiva con la incidencia de casos de estas dos especies fúngicas que predominan durante la fase tardía de madurez (Visconti *et al* FAO/OMS, 1999).

Las fumonisinas producidas por el genero *Fusarium*.

Las fumonisinas son el grupo de micotoxinas más recientemente descubiertas y son producidas principalmente por *Fusarium moniliforme* Sheldon, la fumonisina B1 (FB1) es la molécula predominante producida por el hongo. La fumonisina ha sido asociada con ciertas enfermedades en animales como son la leucoencefalomalacia en equinos (LEME) y edema pulmonar porcino (EPP). El mecanismo general de acción de las fumonisinas es la disrupción de síntesis de esfingolípidos.

Visconti *et al* (FAO/OMS, 1999) menciona que son los compuestos que principalmente están en los cultivos fúngicos del maíz, habiéndose demostrado que se dan naturalmente en niveles biológicamente importantes en el maíz y en varios alimentos a base de maíz para seres humanos y piensos en varios países de todo el mundo. Por ejemplo en Filipinas, Tailandia e Indonesia se ha observado una contaminación del 50% en el maíz. Los países africanos son los más afectados hasta en un 90%. En estos países se han detectado niveles de fumonisina en maíz de 2000 µg/kg y en alimento para animales rangos de 4000 a 11000 µg/kg. Otros investigadores mencionan la presencia de fumonisina en Argentina, Costa

Rica, Honduras y Venezuela pero en cantidades que van de 1 a 15 µg/g, afectando principalmente al maíz amarillo y en el 83% de las muestras analizadas (Chulze *et al*, 1996), (Placinta *et al*, 1999), (Gordon *et al*, 2000), (Medina y Martínez, 2000).

Estructura química.

Las fumonisinas fueron primeramente aisladas del hongo *Fusarium moniliforme*, aun cuando otras especies de *Fusarium* pueden producirlas, como *Fusarium proliferatum*, *Fusarium nygamai*, *Fusarium anthophilium*, *Fusarium dlamini* y *Fusarium napiforme*. Recientemente un hongo *Alternaria* sp también mostró la capacidad de producir Fumonisina B1. Estos son compuestos altamente polares, por lo que son solubles en agua, pero insolubles en solventes orgánicos (Ross *et al*, 1990), (Nelson, 1992).

Seis diferentes fumonisinas han sido aisladas e identificadas: fumonisina A1, A2, B1 (descubierta en 1988), B2, B3 y B4, sin embargo solo FB1, FB2 y FB3 han sido detectadas como contaminantes naturales en maíz. (Placinta *et al*, 1999), (D'Mello *et al*, 1999) (figura 1.9).

1.8.4 Las fumonisinas su mecanismo de acción y toxicidad.

Diferentes autores mencionan que la Fumonisina B1 interfiere con la biosíntesis de los esfingolípidos o la esfingosina (So), debido a que la FB1 en parte de su estructura química es similar al complejo alcohol-amino de la esfingosina (So). (figura 1.10)

Estos esfingolípidos (fosfoesfingolípidos y glicoesfingolípidos) son importantes en la integridad de la membrana celular, en la comunicación intercelular, en el contacto celular, así como, en la actividad fisiológica de las células de los animales y en las células vegetales tiene una acción fitotóxica dañando la membrana y reduciendo la síntesis de clorofila.

Los esfingolípidos son encontrados en abundancia en cerebro y tejido nervioso. Por ejemplo los glicoesfingolípidos son uno de los mayores componentes de los lípidos que forman la mielina, la cual es un constituyente de la membrana de los oligodendrocitos y de las células de Schwann, en el sistema nervioso central y periférico, lo que explica las

alteraciones observadas en equinos. La esfingosina (So) es sintetizada en retículo endoplásmico, a partir de esfinganina (Sa). (Mayes, 1988), (Whang *et al*, 1991), (Visconti *et al*, 1999), (Figura 1.11).

1.8.5 Fumonitoxicosis en pollos.

Existen evidencias de daño bioquímico, celular y morfológico en los animales que consumen alimento contaminado con fumonisinas. Dentro de las alteraciones que se observan en equinos, cerdos, rumiantes y pollos se encuentran daño hepático, del tracto gastrointestinal, cerebro, pulmón y mortalidad, así como, un efecto inmunodepresor al inhibir la replicación de células leucocitarias e inhibir la actividad fagocítica de los macrófagos, aun cuando la información es limitada respecto a los efectos de la fumonisina B1 sobre el sistema inmune de los pollos (D'Mello *et al*, 1999), (Placinta *et al*, 1999), (Ledoux *et al*, 1999).

Las dosis que se han utilizado en los pollos de engorda son relativamente altas a las observadas de manera natural (0 a 5 mg/kg FB1) (Murphy *et al*, 1993). Ledoux *et al* (1999) observó alteraciones en el peso corporal, peso de órganos y alteración en la química sanguínea al utilizar dosis de 300 y 400 mg/kg (ppm), similar a lo observado por Brown *et al* (1992), Bailly *et al* (2001) proporcionó dietas contaminadas con fumonisina a patos con dosis de 5, 15 y 45 mg/kg de FB1 observando alteración en el desempeño productivo aún con la dosis más baja en comparación con el grupo control. Todos los autores coinciden en que los pollos jóvenes son los más susceptibles.

Otros ejemplos:

1.- Pollitos de 2 días de vida 10 ppm de fumonisina B1 en 6 días presentaron diarreas, disminución del peso vivo y de los pesos absolutos del hígado, bazo y bolsa de Fabricio, hubo una disminución de los niveles de triglicéridos, ácido úrico y de la actividad de la fosfatasa alcalina, los niveles de la gamma-glutamyl transferasa, aspartatoamino transferasa, deshidrogenasa láctica, creatinquinasa y colesterol, aumentaron.

2.- Pollitos de 1 día de vida, 75 a 525 ppm, 21 días con contaminaciones de 450 y 525 ppm hubo una disminución del consumo de pienso y la ganancia de peso vivo, los pesos relativos del riñón y del hígado aumentaron y los niveles de esfinganina libre y de esfinganina/esfingosina, aumentaron.

3.- Con contaminaciones de 225 ppm, fueron observadas lesiones histológicas en el hígado. Con contaminaciones de 75 ppm, los pollitos se vieron fisiológicamente afectados y hubo un aumento en los niveles de esfinganina libre y de esfinganina/esfingosina (Gimeno, 1991).

Alteraciones observadas en pruebas de laboratorio.

El calcio sérico, el colesterol, AST (aspartato aminotransferasa), FA (fosfatasa alcalina), LDH (lactato deshidrogenasa) y GGT (gamma glutamiltransferasa) se incrementan, del mismo modo se elevan los niveles séricos de esfingolípidos y la relación esfinganina/esfingosina (Engelhardt *et al*, 1989), (Ledoux *et al*, 1992), (Brown *et al*, 1992), (Bailly *et al*, 2001).

Signos clínicos y alteraciones morfológicas.

Dentro de los signos clínicos observados están diarrea, reducción del peso corporal, incremento del peso relativo del hígado, molleja y proventrículo, aumento de la conversión alimenticia y alta mortalidad. Los hallazgos morfológicos macroscópicos correspondieron a ascitis, hidropericardio y miocardio pálido. Lesiones ulcerativas en boca se observaron en pavos. Histológicamente el hígado presentó cambio graso, necrosis multifocal, hiperplasia de conductos biliares y de cordones hepáticos; degeneración y necrosis cardíaca (miocardio). En timo atrofia de corteza, así como discondroplasia; en intestino delgado se reporta moderada atrofia de vellosidades (Engelhardt *et al*, 1989), (Ledoux *et al*, 1992), (Brown *et al*, 1992).

1.9 INTERACCIÓN DE AFLATOXINA Y FUMONISINA.

Aun cuando existen algunos informes sobre la contaminación conjunta de diversas toxinas (Jelinek *et al*, 1989), (Michael *et al*, 1998), (D'Mello *et al*, 1999), (Medina and Martínez, 2000) lamentablemente, la información sobre toxicidad, estabilidad y grado de incidencia de muchas de las micotoxinas que se han identificado aún hoy en día es escasa y más aún en el caso del efecto combinado de dos o más micotoxinas. Esto hace que el proceso para decidir el o los métodos para su control, resulten ser complicados.

Por lo tanto, la presencia de múltiples toxinas en el mismo sistema proporciona nuevos motivos de preocupación, dado que la información toxicológica sobre los efectos de la exposición simultánea es todavía muy limitada. El uso de diversas materias primas susceptibles de estar contaminadas por más de una micotoxina, hace que el problema del efecto de éstas sea un riesgo mayor para la salud animal y por lo tanto para la economía avícola. Por falta de información es difícil prever los efectos de toxinas múltiples; para ello ciertos estudios *in vitro* pueden ayudarnos a predecir los resultados, sin embargo para una comprensión integral, es necesario la realización de estudios *in vivo*, permitiendo al organismo animal participar en el proceso de intoxicación (Gelderblom *et al*, 2002).

Estudios recientes han demostrado que la exposición simultánea a aflatoxina B1 y fumonisina B1 puede provocar respuestas diferentes que la exposición a esas toxinas por separado (Placinta *et al*, 1999), (Medina and Martínez, 2000), si bien se ha observado este comportamiento, aún hay pocos estudios sobre la interacción de estas dos micotoxinas. Este resultado puede deberse a una combinación de una multitud de factores entre los que se incluyen la interacción química o la potenciación/inhibición de diferentes vías metabólicas o bien puede que la respuesta general se deba al equilibrio entre diversas reacciones. Por consiguiente, diferentes grados de contaminación pueden representar diferentes alteraciones para la salud animal y humana. (Gelderblom *et al*, 2002).

2.- OBJETIVOS.

- 1.- Evaluar el efecto de la presencia de dosis bajas de micotoxinas de *Aspergillus flavus* link y *Fusarium monilliforme*, sobre los principales parámetros productivos en pollo de engorda.
- 2.- Evaluar el efecto sinérgico de las micotoxinas de *Aspergillus flavus* link y *Fusarium monilliforme*, sobre los principales parámetros productivos en pollo de engorda.
- 3.- Evaluar las alteraciones bioquímicas en pruebas de laboratorio de pollos de engorda alimentado con maiz contaminado con las micotoxinas de *Aspergillus flavus* link y *Fusarium monilliforme*.
- 4.- Evaluar la respuesta inmune en pollo de engorda alimentado con maiz contaminado con las micotoxinas de *Aspergillus flavus* link y *Fusarium monilliforme*.

3. HIPÓTESIS.

El consumo mixto de aflatoxinas y fumonisinas impactará negativamente sobre las variables productivas, así como en la química sanguínea y respuesta inmune en el pollo de engorda.

4.- JUSTIFICACIÓN.

Debido a que los cereales son utilizados como materia prima para la elaboración de alimentos balanceados y que estos frecuentemente están contaminados con algún tipo de micotoxina y que estas toxinas afectan seriamente a los animales y al hombre, hace necesario tener un conocimiento más profundo del efecto causado por la interacción de aflatoxinas y fumonisinas.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1 Metodología.

La metodología general para el experimento se dividió básicamente en tres etapas:

- Etapa 1. Producción estandarización de toxinas y preparación de dietas.
- Etapa 2. Aplicación de dietas y toma de muestras.
- Etapa 3. Procesamiento de muestras.
- Etapa 4. Analisis Estadístico.

A continuación se detalla las actividades realizadas para cada etapa:

5.1.1 Etapa 1. “Producción, estandarización de toxinas y preparación de dietas”.

a) Cultivos.

Aspergillus flavus link productor de aflatoxina B1 y B2, se cultivo en medio PDA. (papa dextrosa agar) a 27°C por 7 días y después se almaceno a 3°C hasta su posterior uso.

Fusarium moniliforme productor de fumonisina B1 se cultivo en medio PDA. (papa dextrosa agar) en tubo a 25°C por 14 días y después se almaceno a 4°C hasta su uso.

b) Inoculación y cultivo.

La cepa de *Aspergillus flavus* link se resuspendió en una solución de Tween 80 al 1% en H₂O estéril para obtener una suspensión de esporas y se inoculó en maíz previamente esterilizado el cual se mantuvo en incubación por 20 días a 27°C y posteriormente se esterilizó para la eliminación del microorganismo y continuar la cuantificación de aflatoxinas.

La cepa de *Fusarium moniliforme* se resuspendió en una solución de Tween 80 al 1% en H₂O estéril, para obtener una suspensión de esporas y se inoculó en maíz previamente esterilizado el cual se mantuvo en incubación por 26 días a 25°C y posteriormente se esterilizó para la eliminación del microorganismo y continuar la cuantificación de fumonisinas.

c) Determinación de la concentración de micotoxinas.

Después de este periodo y al observar un crecimiento uniforme de las especies fúngicas, se procedió a medir la concentración de toxinas producidas en el maíz, aflatoxina B1 y B2 para el material inoculado con *Aspergillus flavus* link y fumonisina B1 para el material inoculado con *Fusarium moniliforme*.

La técnica usada para la determinación de las micotoxinas fue cromatografía de columnas de inmunoafinidad en ambos casos. El método usado para aflatoxina B1 fue Aflatest B de Vicam Corp (OMA, 1999). En el caso de Fumonisina B1 se utilizó Fumonitest B de Vicam Corp (OMA, 1999).

d) Preparación de dietas y protocolo de alimentación.

Posteriormente de haber obtenido las concentraciones finales de las micotoxinas, se procedió a diluir el maíz contaminado, con maíz probado libre de micotoxinas, para estandarizar la concentración de toxinas para el caso de Aflatoxina B1 y B2 de 500 ppb (0.5 mg/kg) y para la fumonisina B1 de 80 ppm (80 mg/kg) posteriormente se realizó el molido y mezclado del maíz.

Con este maíz se prepararon 4 dietas correspondientes a los tratamientos que se usaron en este experimento que a continuación se detallan.

- Tratamiento 1.- Maíz con Aflatoxina 500 ppb.
- Tratamiento 2.- Maíz con Fumonisina 80 ppm.
- Tratamiento 3.- Maíz con Aflatoxina 500 ppb y Fumonisina 80 ppm.
- Tratamiento 4 (Control).- Maíz libre de toxinas

5.1.2 Etapa 2. “Aplicación de dietas y toma de muestras”.

Día 1.

Se utilizaron 40 pollos de engorda Arbor Acres X Arbor Acres de 1 día de edad, para la aplicación de las cuatro dietas correspondientes a los cuatro tratamientos cada uno con 10 animales. El alimento se suministró *ad libitum*. Cabe mencionar que el alimento únicamente consistió en maíz contaminado con algún tipo de micotoxina o la combinación. Este manejo influyó directamente sobre el peso de los animales.

El agua de recepción contenía vitaminas (A, D3, E, B1, B2, B6, B12, Nicotinamida Y Ca.) La temperatura de recepción fue de 33°C y disminuyó 2°C semanalmente.

Al inicio del trabajo experimental, las aves fueron pesadas individualmente y distribuidas homogéneamente en los 4 tratamientos, lo que fue con la finalidad de iniciar el trabajo experimental sin diferencia estadística entre los pesos de las aves.

Adicionalmente se sacrificaron 5 animales del mismo lote, a los cuales se les realizó la necropsia y se tomó sangre sin anticoagulante para obtener suero para posteriores análisis.

Las siguientes actividades fueron realizadas como se describe:

Día 4.

Vacunación de las aves de todos los tratamientos contra la enfermedad del Newcastle cepa La sota por vía ocular.

Día 7.

Cambio de agua para todas las aves.

Día 8.

Determinación del peso de las aves por tratamiento e individualmente, así como del alimento restante de cada tratamiento y colocación de alimento nuevo, 1500 grs. por tratamiento.

Día 12.

Sacrificio de 3 animales por tratamiento, necropsia correspondiente toma se sangre completa y suero.

Día 13.

Se determino el peso del alimento restante y se les proporcionó alimento nuevo, 1500 grs. por tratamiento.

Día 15.

Determinación del peso de las aves por tratamiento e individualmente.

Día 20.

Se determino el peso del alimento restante y se les proporcionó alimento nuevo, 2000 grs. por tratamiento.

Día 22.

Determinación del peso de las aves por tratamiento e individualmente.

Día 29.

Sacrificio de todos los animales.

Determinación del peso al alimento sobrante.

Determinación del peso de las aves por tratamiento e individualmente.

Necropsia correspondiente.

Toma de sangre completa y suero.

Peso hepático.

5.1.3 Etapa 3. “Procesamiento de muestras”.

- Del suero obtenido los días 1, 12 y 29, se utilizó para las siguientes pruebas:
 - Inhibición de la Hemoaglutinación para el virus del Newcastle, usando un protocolo estandar (OIE 2004).
 - Determinación de la Alaninamino-Transferasa ALT, usando kits comerciales marca Wiener Laboratorios S.A.I.C utilizando un espectofotómetro marca Beckman Coulter, modelo DU530.
 - Determinación de la Aspartatoamino-Transferasa AST usando kits comerciales,marca Wiener Laboratorios S.A.I.C utilizando un espectofotómetro marca Beckman Coulter, modelo DU530.
- De la sangre completa obtenida los días 12 y 29. Se utilizó para la siguiente prueba:
 - Determinación de la concentración de Hematocrito (Coles, H, 1989).
- De los pesos del alimento y de cada animal se realizaron los cálculos para determinar:
 - Consumo de alimento.
 - Ganancia total de peso.
 - Conversión alimenticia.

5.1.4 Etapa 4. “Análisis estadístico”.

El análisis estadístico para cada dato, se realizó con un diseño completamente al azar (One Way ANOVA), con comparación de medias con la prueba de Tukey; éstos análisis de datos se realizaron con el paquete estadístico StatPoint® STATGRAPHICS Centurion® versión 15.1.0.2.

6.- RESULTADOS.

6.1. Peso de los animales.

En cuanto al peso de los animales para cada tratamiento, se pesaron los días mencionados (1, 8, 12, 15, 22, 29) obteniendo el peso promedio por tratamiento (tabla 6.1).

Para el día 8 del experimento, los pesos se comportaron de la siguiente forma: el tratamiento número 3 (AFB+FB1) registró el menor peso con 44.22 grs. en promedio, teniendo esta diferencia estadística ($p < 0.05$) con los demás tratamientos. El mejor peso lo presentó el tratamiento 4 (control) con 54.61 grs. sin tener diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$).

Para el día 12, el tratamiento 3 (AFB+FB1) continuó siendo el de menor peso con 49.40 grs. en promedio, seguido del tratamiento 2 (FB1) con 53.06 gr ($p > 0.05$); ambos tratamientos fueron estadísticamente menores al compararlos con los tratamientos 1 y 4 (57.83 grs. y 56.50 grs.) ($p < 0.05$).

En el día 15, el tratamiento con mayor peso fue el tratamiento 1 (AFB) con 62.15 grs., y el de menor peso nuevamente fue el tratamiento 3 (AFB+FB1) con 49.10 grs. ($p < 0.05$).

Este mismo comportamiento del tratamiento 3 (AFB+FB1) se registró para el día 22 y el día 29 (tabla 6.1).

6.2. Consumo de alimento.

Para el consumo de alimento se calcularon las diferencias del alimento ofrecido y el alimento recolectado y se dividieron por el número de animales en cada tratamiento y se obtuvo el promedio de consumo para cada animal (tabla 6.2)

Para el día 8 los promedios de consumo por animal se comportaron de la siguiente manera: el tratamiento que obtuvo el mayor consumo de alimento fue el número 4 con 84.0 grs. por animal y el que obtuvo el menor consumo fue el 2 con 57.0 grs. el tratamiento 1 y 3 presentaron consumos de 82.0 grs. y 65.0 grs. respectivamente; todos los tratamientos tuvieron diferencia estadística entre ellos ($p < 0.05$).

En el día 13, el tratamiento que presentó el menor consumo fue el número 3 con 35.0 grs. y el que presentó el mayor consumo fue el tratamiento 1 con 63.0 grs. Los tratamientos 2 y 4 obtuvieron 43.0 grs. y 52.0 grs., respectivamente; todos los tratamientos tuvieron diferencia estadística entre ellos ($p < 0.05$).

En el día 20 del experimento, el mayor consumo lo obtuvo nuevamente el tratamiento 1 con 102.9 grs. y el menor fue el tratamiento 4 con 77.1 grs.; el tratamiento 2 presentó un consumo promedio de 85.7 grs. y el tratamiento 3 obtuvo 78.6 grs.; todos los tratamientos tuvieron diferencia estadística entre ellos ($p < 0.05$).

Para el final del experimento, el día 29 se mantuvo esa tendencia; el mayor consumo lo obtuvo el tratamiento 1 con 167.1 grs. y el menor consumo lo obtuvo el tratamiento 4 con 81.4 grs; el tratamiento 2 obtuvo 82.9 grs. y el tratamiento 3 consumió 88.6 grs.; todos los tratamientos tuvieron diferencia estadística entre ellos ($p < 0.05$).

6.3. Conversión alimenticia.

La conversión alimenticia se calculó al final del proyecto (tabla 6.3), obteniéndose una conversión de 5.47 para las aves del tratamiento 1 (AFB), seguido del tratamiento 3 (AFB+FB1) con 5.00, y del tratamiento 4 (control) con 4.46 y finalmente el tratamiento 2 (FB1) con 3.88, Este último fue el que mostró diferencia estadística con los demás ($p < 0.05$).

6.4 Pruebas de daño hepático.

Se realizaron las determinaciones en suero de ALT (Alaninamino-Trasferasa) y de AST (Aspartatoamino-Trasferasa). Con la técnica antes mencionada para la toma de muestra de los días 12 y 29, los resultados de los promedios se reflejan en la tabla 6.4 y la tabla 6.5.

6.4.1 ALT

El tratamiento que presentó la concentración más alta, fue el tratamiento 3 (AFB+FB1) con 78 unidades internacionales (UI) siendo estadísticamente diferente ($p < 0.05$) respecto a los otros tratamientos. Como se puede observar, el tratamiento 4 (control) obtuvo 48.33 UI; los tratamientos 1 y 2 presentaron 59.33 UI y 51.66 UI unidades respectivamente, sin diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$).

En el muestreo del día 29 al final del experimento, el tratamiento que presentó la concentración más alta fue el numero 1 (AFB) con 66.66 UI, teniendo diferencia estadística ($p < 0.05$) con los demás tratamientos. El tratamiento 3 (AFB+FB1) presentó 56.28 UI teniendo éste diferencia estadística ($p < 0.05$) con los demás tratamientos, los tratamientos 2 y 4 presentaron 43.83 UI y 41.2 UI respectivamente sin diferencia estadística ($p > 0.05$) entre ellos.

6.4.2 AST

Para esta transaminasa el día 12 se obtuvieron los siguientes valores: el tratamiento 3 (AFB+FB1) con 352.0 UI fue el más afectado presentando diferencia estadística ($p < 0.05$) con los demás. El tratamiento 1 (AFB) obtuvo en promedio 290.0 UI; los tratamientos 2 (FB1) y 4 (control) presentaron 314.33 y 301.33 unidades respectivamente. Estos tres tratamientos no tuvieron diferencia estadística entre ellos ($p > 0.05$).

Al día 29, final del experimento, los tratamientos 1 (AFB) y el 3 (AFB+FB1) mostraron 300.09 y 276.71 UI respectivamente, sin presentar diferencia estadística ($p>0.05$) entre ellos, pero si al compararlo con los tratamientos 2 (FB1) y el 4 (control) que presentaron en promedio el tratamiento 2 (FB1) de 192.71 y de 168.0 para el 4 (control), sin presentar diferencia estadística entre estos últimos dos ($p>0.05$).

6.5 Prueba de la inhibición de la hemoaglutinación. (HI).

Con los sueros obtenidos, se determinó la respuesta inmune contra la vacunación del Virus del Newcastle por la técnica de HI, los resultados se expresan en LOG base 10 para las dos tomas de muestras realizadas, se promediaron para cada tratamiento (tabla 6.6).

Para los resultados del día 12 los tratamientos 1 (AFB), 2 (FB1), 3 (AFB+FB1) se comportaron de la misma forma teniendo 2.308 LOG base 10 en promedio para todas sus mediciones; el único tratamiento que tiene un ligero cambio fue el tratamiento 4 (control) que tuvo 2.408 LOG base 10, sin embargo ninguno de los tratamientos tuvieron diferencia estadística ($p>0.05$) entre ellos.

En el día 29 del experimento los resultados fueron los siguientes; el tratamiento que obtuvo el mayor valor logarítmico fue el número 3 (AFB+FB1) con 1.505 LOG base 10 seguido por el número 2 (FB1) con 1.290 LOG base 10 y teniendo el mismo valor de 1.254 LOG base 10 se colocaron el tratamiento 1 (AFB) y 4 (control). Ninguno de los tratamientos tuvieron diferencia estadística ($p> 0.05$) entre ellos.

6.6 Peso hepático.

Al final del experimento durante la necropsia de los animales se determinó el peso hepático, (tabla 6.7).

El tratamiento que tuvo mayor peso hepático fue el tratamiento 1 (AFB) con 2.65 grs. en promedio, seguido por el 2 (FB1) con 2.44 grs., el tratamiento 3 (AFB+FB1) y 4 (control)

con 2.37 grs. y 2.30 grs. respectivamente. Ninguno de los tratamientos mostró diferencia estadística entre ellos ($p>0.05$).

6.7 Porcentaje de Hematocrito.

Con la sangre recolectada el día 12 y el día 29 se realizó la determinación del porcentaje de hematocrito en los animales. Estos resultados se promediaron por tratamiento y se presentan en la tabla 6.8

Para el día 12 el tratamiento que obtuvo el valor más alto de hematocrito fue el tratamiento 4 (control) con 29.66% y el que obtuvo el valor más bajo fue el tratamiento 3 (AFB+FB1) con 27.66%; el tratamiento 1 (AFB) y 2 (FB1) obtuvieron 29.00% y 29.33% respectivamente ($p>0.05$).

En el último muestreo el tratamiento con el porcentaje de hematocrito mas bajo fue el 2 (AFB) con 21.17% teniendo diferencia estadística solo con el tratamiento 4 (control) que obtuvo 25.88%. Los tratamientos 1 (AFB) y 3 (AFB+FB1) obtuvieron 22.60% y 23.58% respectivamente y no tuvieron diferencia estadística ($p>0.05$) entre ellos, ni entre los demás tratamientos.

7.- DISCUSION.

Las aves utilizadas en este estudio y que estuvieron distribuidas en alguno de los 4 tratamientos únicamente fueron alimentadas con maíz quebrado, con y sin micotoxinas, lo que influyó en peso, el consumo y la conversión alimenticia, por lo que los resultados obtenidos están abajo del promedio marcado para la estirpe utilizada. La finalidad de este manejo alimenticio, fue la de observar el efecto de las aflatoxinas y fumonisinas en condiciones de deficiencia nutricional y maximizar el efecto tóxico.

Como se ha descrito por diversos investigadores, la ganancia de peso no se ve afectada por niveles bajos de fumonisina (FB) similares a los utilizados en este trabajo, mencionando que se necesitan más de 100 mg. de FB/kg. (100 ppm) de alimento para impactar negativamente los estimadores productivos en el pollo de engorda; situación similar ocurre con niveles bajos de aflatoxina (AFB) como los utilizados en este estudio (Brown *et al*, 1992; Kubena *et al*, 1997; Ledoux *et al*, 1992; Bailly *et al*, 2001). Para que las aves se vean afectadas por la ingestión de alimento contaminado con aflatoxinas es necesario utilizar concentraciones de 1 mg. (1000 ppb) de AFB/ kg. de peso, afectando la ganancia de éste; sugiriendo que por cada mg./kg. que se incrementa, la aflatoxina (AFB) en la dieta de pollos de engorda, el crecimiento se deprime en un 5% (Drsjant-Li *et al*, 2003; Del Río *et al*, 2006).

Sin embargo al estar presente AFB+FB en combinación, el peso promedio disminuyó respecto al peso de las aves control a pesar de las concentraciones utilizadas para cada una de las micotoxinas. Éste es un dato valioso ya que los niveles que se han reportado en sorgo y maíz contaminados de forma natural para fumonisina B1, varían de 0.07 a 8 y de 0.04 a 65 mg. /kg. respectivamente para cada grano, así como, también se ha reportado la presencia de estas dos micotoxinas en estos granos y alimento utilizado para la alimentación del pollo de engorda (Prathapkumar y Bhat, 1997). Asimismo se han realizado estudios sobre el efecto individual y combinado de diversas micotoxinas como son las aflatoxinas y ocratoxina A (Huff *et al*, 1983), aflatoxina y diacetixicirpenol (Kubena *et al*,

1995) y las toxinas producidas por el género *Fusarium sp* como T2, DON y fumonisina B1 (Kubena *et al*, 1997). En México existen reportes donde la concentración de aflatoxina en granos y alimentos detectados va en promedio de 61 a 71 $\mu\text{g. /kg.}$ de alimento en el 60% de las muestras analizadas (Flores *et al*, 2006), valores que están por arriba de la norma oficial mexicana permitidos para consumo humano, pero no para consumo animal, no obstante también hay reportes por arriba de 1 mg. /kg. además de detectar presencia de otras micotoxinas en las mismas muestras analizadas (Méndez-Albores *et al*, 2004). Respecto a la fumonisina (Robledo *et al*, 2001) mencionan que todas las muestras analizadas fueron positivas a FB1 con una concentración promedio de 2,541 $\mu\text{g. /kg.}$ de alimento, concentración menor a la utilizada en este trabajo. (Rosiles *et al*, 1996) reportan 10 mg. /kg. en muestras de maíz que causaron leucoencefalomalacia en equinos.

Es evidente que el grupo de aves que consumieron aflatoxina en alimento fueron las que obtuvieron mayor peso, incluso que las aves del grupo control, sin embargo, esto se explica a que el consumo de alimento fue mayor para las aves del grupo con aflatoxinas.

Investigadores como Kubena *et al* (1997) y Ledoux *et al* (1992), también observaron este comportamiento. La consecuencia de estar presente las aflatoxinas y las fumonisinas en el alimento y que ellas actúen sobre diferentes vías metabólicas, ocasionan un efecto sinérgico ya que la AFB interfiere con la síntesis protéica y las FB ocasionan una disrupción en el metabolismo de los esfingolípidos alterando el crecimiento celular (Soriano *et al*, 2005; Mishra *et al*, 2003).

Respecto a la conversión alimenticia no se hace comparación con otros investigadores, ya que como se mencionó en materiales y métodos, el alimento consistió únicamente en maíz con y sin micotoxinas, y no en el uso de alimento balanceado, por lo que las conversiones salen de los estándares normales, generalmente obtenidos en la industria avícola.

Diversos autores han reportado cambios en hígado, riñón, bolsa de Fabricio y bazo en aves que consumieron aflatoxina (Quist *et al*, 2000, Allameh *et al*, 2005, Perozo *et al*, 2003, Ledoux *et al*, 1992) al igual que este trabajo no observaron cambios en el peso del hígado al utilizar FB en concentraciones menores a 375 mg/kg (Kubena *et al*, 1997). Tampoco se observó en este estudio cambio en el peso relativo del hígado en la combinación de

AFB+FB, a pesar de que Kubena *et al* (1995) en un estudio realizado en su grupo de investigación utilizaron 0.075 mg. de AFB/kg. de alimento y 200 mg. de FB/kg. de alimento. Otros investigadores también describen cambios en el peso del hígado, sin embargo ellos utilizaron una combinación de FB y toxina T-2 (Brown *et a.*, 1992).

El porcentaje promedio de hematocrito de las aves en los diferentes tratamientos no se vió afectado en ninguno de ellos de manera significativa, a pesar que en el segundo muestreo se aprecia un menor porcentaje del hematocrito en las aves que consumieron alimento con fumonisina, sin embargo está dentro de los parámetros descritos en la literatura (Feldman *et al*, 2000). Ésto puede ser debido a que únicamente el alimento contenía 500 µg. AFB/kg. de alimento y 80 mg. de FB/kg. de alimento. Allameh *et al* (2005) y Lanza *et al* (1980) sí observaron alteración en el porcentaje de hematocrito y en la concentración de proteínas plasmáticas al utilizar entre 1 y 2 mg. de AFB/kg. de alimento, este mismo efecto fue reportado por Kubena *et al* (1995) a pesar de haber utilizado únicamente 0.75 mg. de AFB/kg. de alimento. Este mismo autor reporta que la presencia de fumonisina (200 mg./kg.) tampoco afectó el hematocrito. Por lo que podemos concluir que son necesarias concentraciones mayores de AFB para alterar el porcentaje de hematocrito y que la fumonisina a concentraciones hasta 200 mg./kg. de alimento no es capaz de alterar la síntesis de eritrocitos.

La evaluación de ALT en aves es controversial ya que hay autores que mencionan que no es una enzima importante en aves, sin embargo otros autores al evaluar el comportamiento de esta enzima sí encuentran alteración en presencia de micotoxinas (Fernandez *et al*, 1994; Ledoux *et al*, 1992; Bailly *et al*, 2001, Allameh *et al*, 2005). Es este trabajo la evaluación de ALT si denota una elevación sérica al estar presentes las aflatoxinas, no así en las aves que consumieron alimento con fumonisina. Es importante continuar evaluando esta enzima celular, para establecer su importancia en aves y que tan directamente está relacionada con daño hepático.

Respecto a la AST tiene un comportamiento similar a la ALT. La AST es una enzima que indica daño hepático, aunque también se encuentra elevada por daño en músculo estriado.

Los resultados obtenidos concuerdan con Allameh *et al* (2005), a pesar de que ellos utilizaron el doble o más de aflatoxina (1 y 1.5 mg de AFB/kg. durante 21 días).

Respecto al efecto de las fumonisinas, no se observó por parte de Weibking *et al.*, (1993) alteración séricas de AST al utilizar FB desde 75 hasta 525 mg. /kg., lo que concuerda con este trabajo. Por su parte Kubena *et al* (1997 y 1995) al combinar FB (300 y 200 mg. /kg.) con DON (15 mg. /kg.) o AFB (0.75 mg. /kg.), no observaron alteración en los valores séricos de AST cuando estuvo presente la fumonisina sola o en combinación con DON, no así cuando la FB estuvo en combinación con AFB. Este efecto de las aflatoxinas se explica debido a que éstas son toxinas consideradas como hepatotóxicas, causando necrosis del tejido y liberación enzimática celular. Mientras que las fumonisinas al alterar las síntesis de los esfingolípidos necesitaría mayor tiempo de ingestión o concentración para ocasionar necrosis del tejido, además de que las células hepáticas y musculares no se consideran órganos blancos en la fumino toxicosis.

La respuesta vacunal contra la enfermedad de NewCastle no se vio afectada por la presencia de las micotoxinas utilizadas. Ésto concuerda con diversos autores, quienes mencionan que es necesario utilizar más 1 mg. de AFB/kg. de alimento o más 300 mg. de FB/kg de alimento, para afectar la respuesta inmune (Doerr *et al*, 1983, Ghosh *et al*, 1990, Bailly *et al*, 2001).

8.-CONCLUSIONES

1.- La presencia de aflatoxina en concentraciones consideradas como bajas, sí son capaces de alterar algunas de las variables evaluadas en este estudio. No así la presencia de fumonisina.

2.- Se observó un efecto sinérgico de las aflatoxinas y las fumonisinas. Sin embargo sería conveniente realizar estudios en los cuales los niveles de AFB y FB sean los reportados por otros investigadores en los granos en México, permitiendo acercarse a la realidad del país y así evaluar la repercusión de la sinergia de estas micotoxinas en la salud y producción animal.

3.- La determinación sérica de AST, ALT y hematocrito pueden ser utilizadas como herramientas diagnósticas, para evaluar el impacto del consumo de micotoxinas solas o en combinación y preveer alteraciones en el desempeño productivo de las aves.

APENDICE 1 (FIGURAS).

Figura 1.1

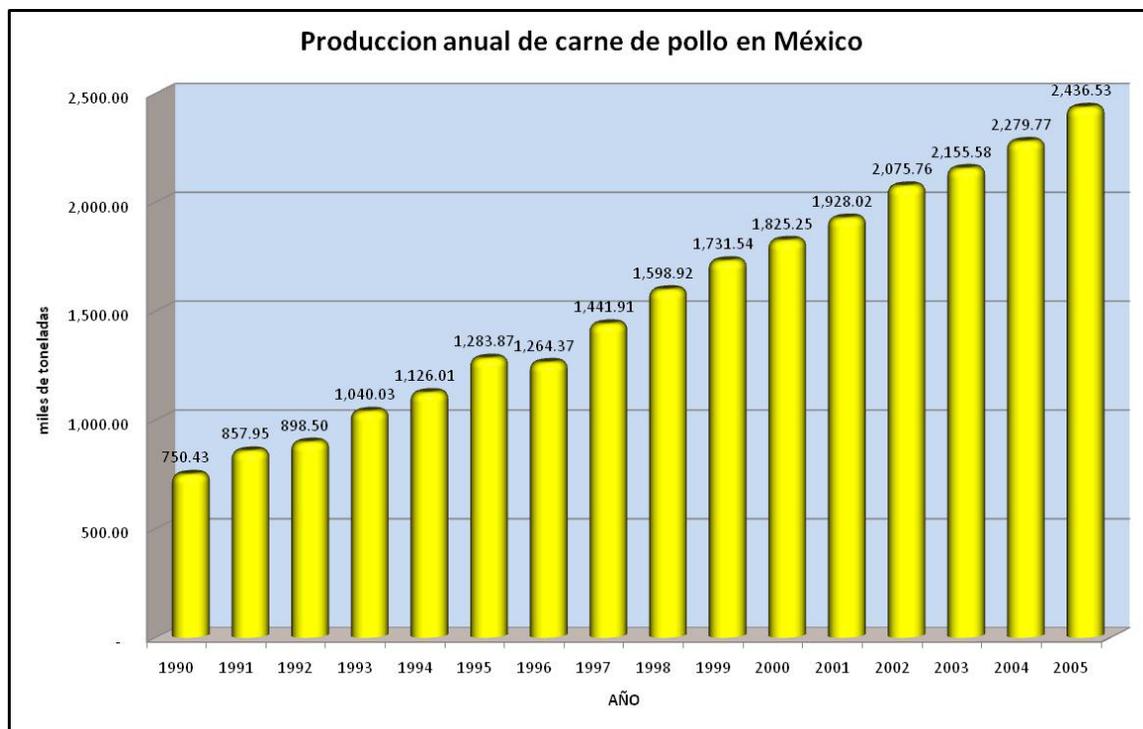


Figura 1.2

Composición porcentual de la producción de carnes en México

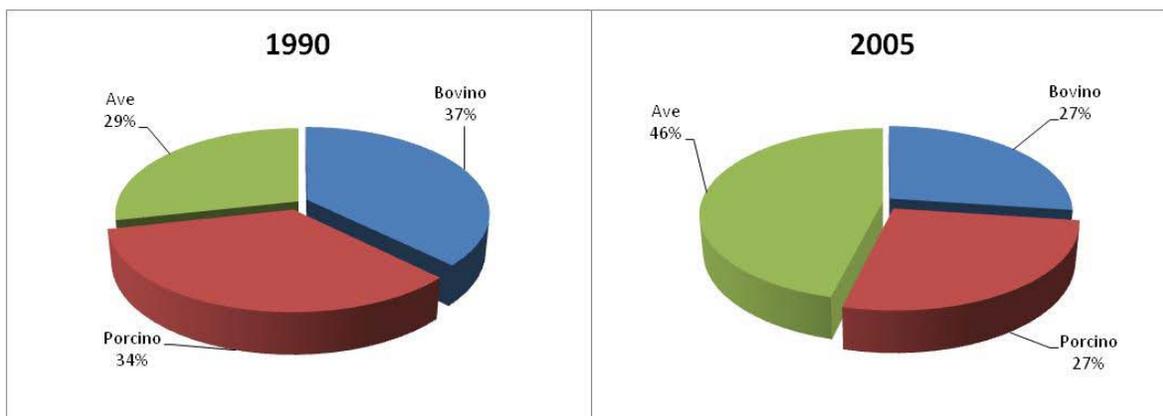


Figura 1.3

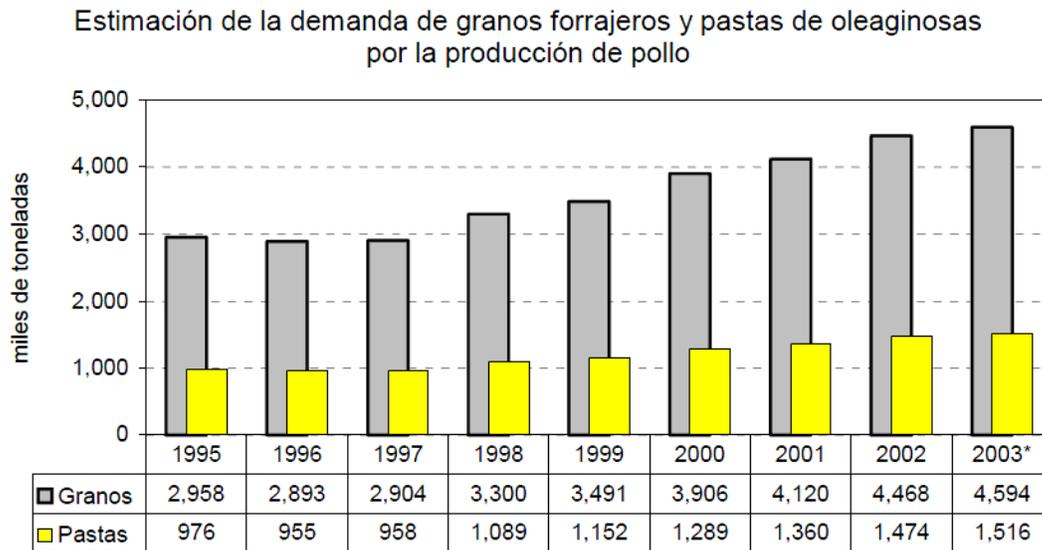


Figura 1.4



Figura 1.5

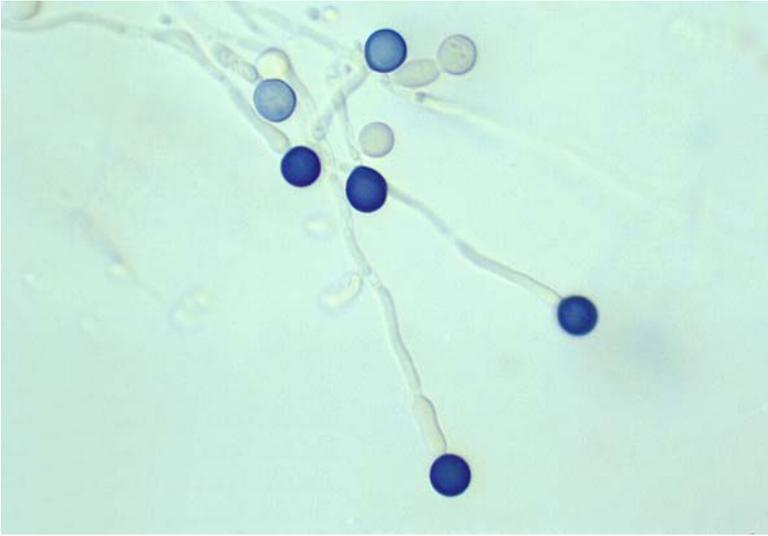


Figura 1.6

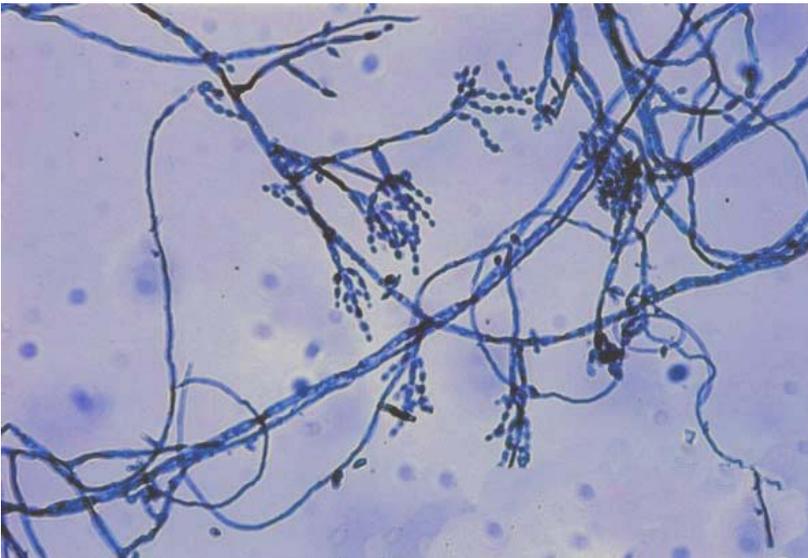
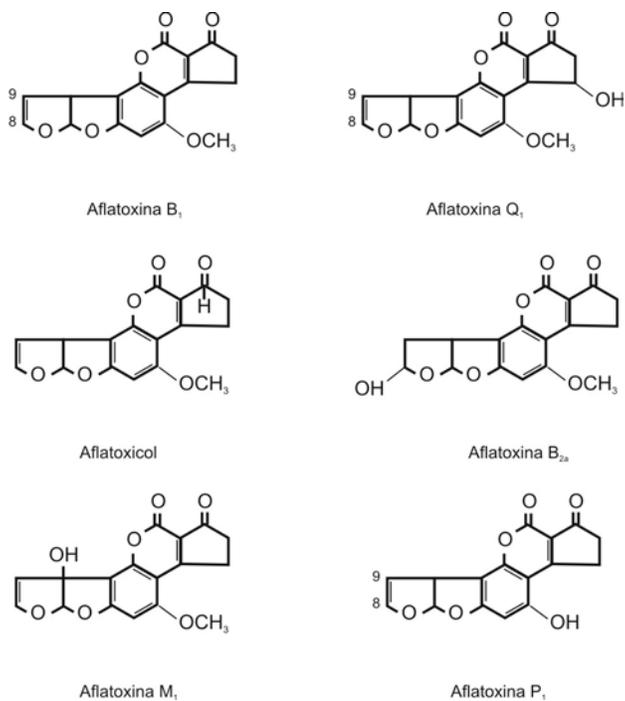
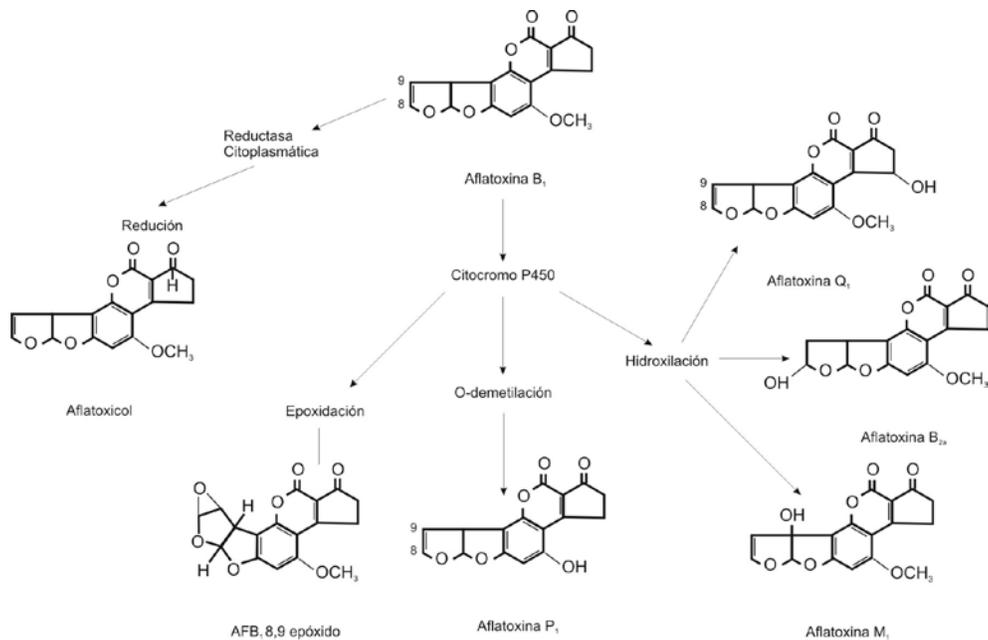


Figura 1.7 Fórmula de las aflatoxinas.



*Modificada de Buchi G. and Rae ID. The structure and chemistry of the aflatoxinas

Figura 1.8 Biotransformación de la Aflatoxina B1



*Modificada de Eaton DL, Rammsdell RG, and Neal GE. Biotransformation of aflatoxins.

Figura 1.9 Fórmula de las Fumonisinias.

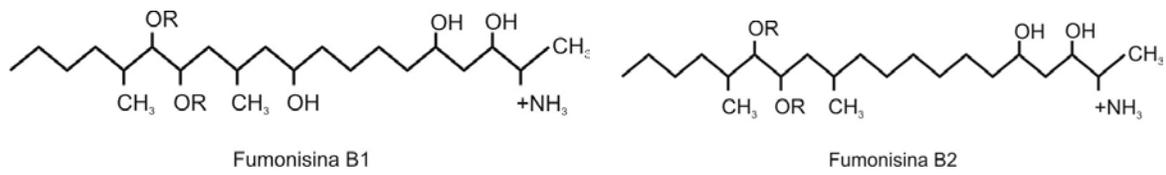


Figura 1.10 Fórmula de la Fumonisinia y la Esfingosina.

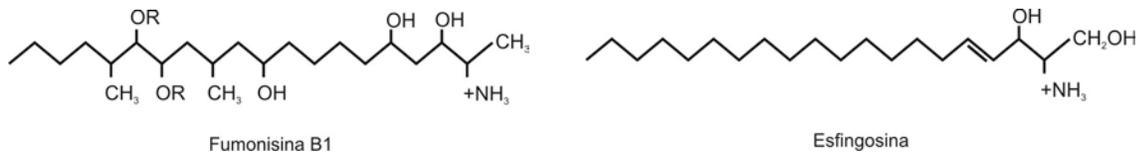
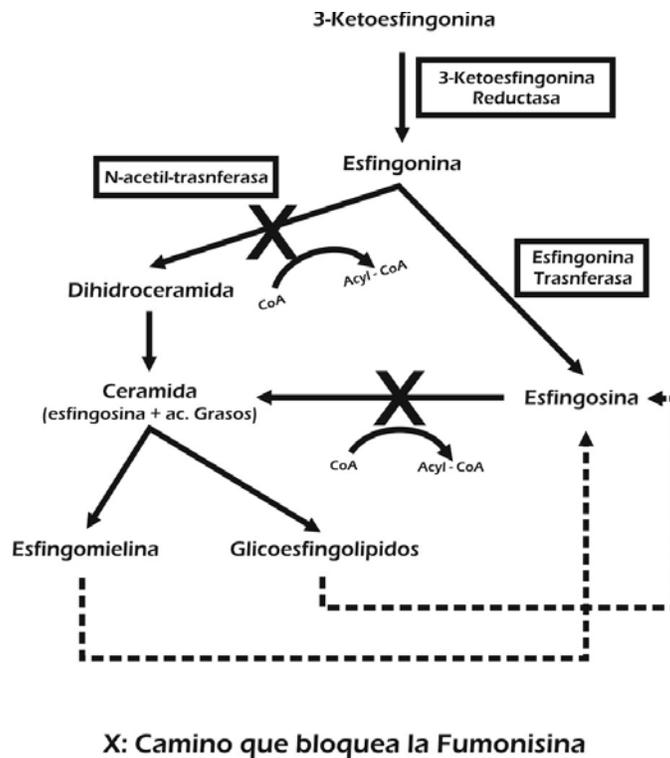


Figura 1.11 Vía que bloquea la fumonisinia



*Modificada de Klaassen CD and Rozman K. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Casarett and Doull's

APENDICE 2 (TABLAS).

1.1 Especies fúngicas y sus diferentes micotoxinas.

Hongo	Toxina
<i>Aspergillus sp</i>	Aflatoxinas Sterigmatocistina Ocratoxina A
<i>Fusarium sp</i>	Tricotocenos (DON, NIV, Toxina T2, DAS) Zearalenonas Fumonisinias Fusarina Moniliformina
<i>Penicillium sp</i>	Patulina Citrinina Ocratoxina A
<i>Alternaria sp</i>	Alternariol Ácido tennazónico
<i>Claviceps sp</i>	Alcaloides

1.2 Tipos ecológicos de Hongos

Tipos de Hongos	Humedad Relativa	Temperatura de Proliferación	O ₂ /CO ₂	Sustrato	Hongos
Micobiota de Campo	95%	Baja	Aerobia	Fitopatógeno Plantas vivas	<i>Fusarium</i> <i>Cladosporium</i> <i>Alternaria</i> <i>Cephalosporium</i> <i>Helminthosporium</i>
Micobiota intermedia	95%	Relativamente Baja	Aerobia	Cereal recién recogido, aún húmedo	Algunos <i>Fusarium</i>
Micobiota de almacenamiento	95%	20-25°C, óptimo a 25°C	Anaerobia Facultativa	Material Fisiológicamente inactivo	<i>Penicillium</i> <i>Aspergillus</i> <i>Mucorales</i>

Tablas de resultados.

6.1 Peso promedio por tratamiento (grs.).

Día	AFB	FB1	AFB + FB1	Control
1	43.50(a)	43.50(a)	43.50(a)	43.50(a)
8	54.63(a)	53.28(a)	48.22(b)	54.61(a)
12	57.83(a)	53.06(ab)	49.40(b)	56.50(a)
15	62.15(a)	57.07(a)	49.10(b)	57.11(a)
22	66.93(a)	66.04(a)	51.98(b)	65.05(a)
29	75.9(a)	69.25(a)	53.41(b)	66.05(a)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

6.2 Consumo de alimento semanal promedio por animal (grs.).

Día	AFB	FB1	AFB + FB1	Control
8	82.0(a)	57.0(b)	65.0(c)	84.0(d)
13	63.0(a)	43.0(b)	35.0(c)	52.0(d)
20	102.9(a)	85.7(b)	78.6(c)	77.1(d)
29	167.1(a)	82.9(b)	88.6(c)	81.4(d)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

6.3 Conversión alimenticia.

	AFB1	FB1	AFB1 + FB1	Control
Consumo total promedio x animal.	415.0	268.6	267.2	294.5
Ganancia total promedio de peso x animal	75.9	69.25	53.41	66.05
Conversión alimenticia	5.47(a)	3.88(b)	5.00(a)	4.46(a)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

6.4 Pruebas de funcionamiento hepático ALT (UI).

Día	AFB	FB1	AFB + FB1	Control
1	19.25(a)	19.25(a)	19.25(a)	19.25(a)
12	59.66(a)	51.66(a)	78.00(b)	48.33(a)
29	66.66(a)	43.83(c)	56.28(b)	41.20(c)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

6.5 Pruebas de funcionamiento hepático AST (UI).

Día	AFB	FB1	AFB + FB1	Control
1	98.6(a)	98.6(a)	98.6(a)	98.6(a)
12	290.00(a)	314.33(a)	352.00(b)	301.33(a)
29	300.90(a)	192.71(b)	276.71(a)	168.00(b)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

6.6 Pruebas de inhibición de la hemoaglutinación (HI).

Día	AFB	FB1	AFB + FB1	Control
12	2.308(a)	2.308(a)	2.308(a)	2.408(a)
29	1.254(a)	1.290(a)	1.505(a)	1.254(a)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

6.7 Peso hepático promedio al final del experimento (grs.).

Día	AFB	FB1	AFB + FB1	Control
29	2.65(a)	2.44(a)	2.37(a)	2.30(a)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

6.8 Hematocrito (%).

Día	AFB	FB1	AFB + FB1	Control
12	29.0(a)	29.33(a)	27.67(a)	29.66(a)
29	22.6(a)	21.17(ab)	23.58(ab)	25.88(b)

AFB (Aflatoxinas B1 y B2); FB1 (Fumonisina B1); AFB+FB1 (Aflatoxinas y Fumonisina).

*Literales diferentes en cada fila indican diferencia estadística significativa, con un nivel de significancia de ($p < 0.05$), al comparar las medias con la prueba de Tukey.

9. - REFERENCIAS.

Allameh A, Safamehr A, Mirhadi SA, Shivazad M, Razzaghi-Abyaneh and Afshar-Naderi AA. Evaluation of biochemical and production parameters of broiler chicks fed ammonia treated aflatoxin contaminated maize grains. *An Feed Sci and Tech* 2005; 122: 289-301.

Arshad S, Khan MZ, Siddique M and Javed MT. Studies on enzymes level and residual effects of aflatoxins in experimentally induced mycotoxicosis in broiler chick. *Indian Vet. J.* 70 1993; 10: 898-902.

Asao T, Buchi G, Abbel-Kader MM, Chang SB, Wick EL and Wogan GN. Aflatoxins B and G. *J. Am. Chem. Soc.* 1963; 87: 1076-1077.

Bababunmi EA, Bassir O. A delay in blood clotting of chickens and ducks induced by aflatoxin treatment. *Poult Sci.* 1982; 61(1):166-8.

Bailly JD, Benard G, Jouglar JY, Duran S and Guerre P. Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducks. *Toxicology* 1993; 163: 11-22.

Batra P, Pruthi AK and Sadana JR. Effect of aflatoxina B1, of efficacy of turkey herpesvirus vaccine against Marek's disease. *Res. Vet. Sci.* 1991; 51: 115-119.

Bayman P. and Cotty PG, genetic diversity in *Aspergillus flavus*: association with aflatoxin production and morphology. *Can. J. Bot.* 1993; 71: 23-31.

Betina, V. Biological aspects of micotoxinas. Chap.3 In: *Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier. N. Y. 1989; 42,50,52,101,433.

Bhatnagar D, Cleveland TE and Cotty PJ. Mycological aspects of aflatoxin formation. In: *The toxicology of aflatoxin formation. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. Eaton DL and Groopman, JD (Eds.). Academic Press. N. Y., 1994; 327-346.

Brown TP, Rottinghaus GE and Williams ME. Fumonisin Mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. *Avian Dis.* 1992; 36: 450-454.

Buchi G. and Rae ID. The structure and chemistry of the aflatoxinas. In: *Aflatoxins*. Goldblatt LA, Ed., Academic Press, New York, 1969; 55

Bullerman LB. Methods of detecting micotoxins in foods and beverages. In: *Food and Beverage Micology*. 2nd ed., Beuchat LR, Ed., AVI. New York, 1987; 571.

Cleveland TE and Bhatnagar D. Molecular regulation of aflatoxin biosynthesis. In: *Mycotoxin, Cancer and Health*. Bray G and Ryan D. (Eds.) Louisiana State University Press, Baton Rouge, Louisiana. 1991; 270-287.

Clifford J I and Rees KR. Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. *Nature* 1966; 209: 312-315.

Coles H. *Diagnóstico y Patología en Veterinaria*, 4a ed., Interamericana-McGraw Hill, México, 1989.

- Corrier DE. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunopathol.* 1991; 30: 73-87.
- Chu FS. Recent Progress on Analytical Techniques for Mycotoxins in Feedstuffs. *J. Anim. Sci.* 1992; 70: 3950–3963.
- Chulze SN, Ramirez ML, Farnochi MC, Pascale M and Visconti C. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stage. *J. Agric. Food Chem* 1996; 44: 2797-2801.
- Dafalla R, Yagi AI and Adam SEI. Experimental aflatoxicosis in Hybro-type chicks: sequential changes in growth and serum constituents and histopathological changes. *Vet. Hum. Toxicol.* 1987; 29: 222-226.
- Dalezios JI, Hsieh DPH. and Wogan GN. Excretion and metabolism of orally administrated aflatoxin B1 by Rhesus Monkey. *Food Cosmet. Toxicol.* 1973; 11: 605-616.
- De Hoog GS, Guarro J, Gene J, and Figueras MJ. Atlas of Clinical Fungi, 2nd ed, vol. 1. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2000.
- Del Río JCG, Ávila EG, Casaubon MaTH, Rosiles RM, Ledesma NM, Petrone VM, Moreno EM. Efecto del 25-hidroxicolecalciferol en presencia de aflatoxina B1, sobre el rendimiento productivo y patología de patas del pollo de engorda. *REDVET*, Ref 120604, 2006; Vo. VII, No. 12.
- Diener UL, and Davis ND. Aflatoxin production by isolates of *Aspergillus flavus*. *Phytopathology* 1966; 56: 1390-1393.
- D'Mello JPF and Macdonald AMC. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 1999; 69: 155-166
- D'Mello JPF, Placinta CM, Macdonald AMC. *Fusarium* mycotoxins: a review of global implication for animal health, welfare and productivity. *Animal Feed Science and technology* 1999; 80: 183-205.
- Doerr JA. Impairment of coagulation function during aflatoxicosis in young chickens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1976; 35: 437-446.
- Doerr JA, Huff WE, Wabeck CJ, Chaloupka GW, May JD, Merkley JW. Effects of low level chronic aflatoxicosis in broiler chickens. *Poult Sci.* 1983; 62(10):1971-7.
- Dowd PF. Insect interactions with mycotoxin producing fungi and their host. In: *Aflatoxin and Aspergillus flavus* in corn. Bhatnagar D, Lillehoj EB and Arora DK.(Eds.) Craftmaster Printers, Inc. Opelika, Alabama, 1991; 81-86.
- Drew SW and Demian AL. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 1987; 31: 343-356.
- Drsjant-Li Y, Verstegen MWA, Gerrits WJJ. The impact of low concentrations of aflatoxin, deoxynivalenol or fumonisin in diets on growing pigs and poultry. *Nutr Res Rev* 2003; 16: 223-239
- Eaton DL, Rammsdell RG, and Neal GE. Biotransformation of aflatoxins. In: *The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.* Eaton DL and Groopman JD (Eds.) Academic Press. N. Y. U. S. A., 1994; 45-71.

Edds GT, Nair KP, Simpson CF. Effect of aflatoxin B1 on resistance in poultry against cecal coccidiosis and Marek's disease. *Am J Vet Res* 1973; 34(6):819-26.

Edds GT. Acute aflatoxicosis: a review. *J Am Vet Med Assoc.* Feb 15 1973; 162(4): 304-9.

Engelhardt JA, Carlton WW and Tuite JF. Toxicity of *fusarium moniliforme* var *subglutinans* for chick, duckling and turkey poults. *Avian Dis.* 1989; 33: 357-360.

Ellis WO, Smith J P and Simpson BK Aflatoxins in food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1991; 30(3): 403-439.

Espada YM, Domingo M, Gómez J and Calvo MA. Pathological lesion following an experimental intoxication with aflatoxin B1 in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 1992; 53: 275-279.

Feldman FB, Zinkl JG, Jain NC. *Schalm's Veterinary Hematology.* 5ª Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia USA, 2000.

Fernández A, Verde MT, Gascón M, Ramos J, Gómez J, Luco DF and Chávez G. Variation of clinical biochemical parameters of laying hens and chickens fed aflatoxin-containing feed. *Avian Path.* 1994; 23: 37-47.

Flores OCM, Hernández LBP, Vázquez JM. Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el Año 2003. *Tec Pecú Méx.* 2006; 44: 247-256.

Gallardo NJ, Villamar LA, Guzmán VH. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México 2004. *Coordinación General de Ganadería, SAGARPA Mexico* 2004; 1-27

Gelderblom WCA, Marasas WFO, Lebepe-Mazur S, Swanevelder S. Interaction of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in a short-term carcinogenesis model in rat liver. *Toxicology* 2002; 171: 161-173

Ghosh RC, Chauhan HV, Roy S. Immunosuppression in broilers under experimental aflatoxicosis. *Br Vet J.* 1990; 146(5): 457-62.

Giambrone JJ, Diener UL, Davis ND, Panangala VS, Hoerr FJ. Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. *Poult Sci.* 1985; 64(9): 1678-84.

Gimeno A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984; 67: 194-196.

Gimeno A. *Memorias VII Curso de especialización en nutrición y patología.* Fundación Española para el desarrollo de la nutrición animal, E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Madrid 30 y 31 de mayo, 1991; 1-33.

Gimeno A. *Revisión genérica del problema de los hongos y las micotoxinas en la alimentación animal.* Publicaciones técnicas: Special Nutrients, Inc, Miami (Florida), USA., 1999; 1-53.

Gordon SS, Marasas WFO, Leggott NL, Yazdanpanah H, Rahimian H and Safari N. Natural occurrence of fumonisin in corn from Iran. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48: 1860-1864.

- Haugen A, Groopman JD, Monoclonal antibody to aflatoxin B1-modified DNA detected by enzyme immunoassay Proc. Natl Acad. Sci. USA 1981; 78 (7): 4124-4127.
- Hsieh DPH. and Wong JJ. Pharmacokinetics and excretion of aflatoxins. In: The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance. Eaton DL and Groopman JD (Eds.), Academic Press. N. Y., 1994; 73-99.
- Huff WE, Doerr JA, Wabeck CJ, Chaloupka GW, May JD and Merkley JW. Individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin on brooding in broiler chickens. Poul. Sci 1983; 62: 1764-1771.
- Jacobson WC and Wiseman VR. The transmission of aflatoxin B1 into eggs. Poul. Sci. 1974; 53: 1743-1745.
- Jelinek CF, Pohland AE and Wood GE Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds: An update. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1974; 72: 223-230.
- Kiessling KH. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. Pure and Applied Chemistry 1986; 58: 327-338.
- Klaassen CD and Rozman K. Absorption, distribution and excretion of toxicants. In: Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, 4th ed. Amdur MO, Doull J and Klaassen CD. Pergamon Press, New York, 1991 50-87.
- Krishna SB and Sinha KK Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. In: Mycotoxins in Ecological Systems. Bathnagar D, Lillehoj EB and Arora DK Eds. Marcel Dekker. N. Y. 1991; 59-85.
- Kromidas S, HPLC Made to Measure: A Practical Handbook for Optimization. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 2006; 3-70
- Kubena LF, Harvey RB, Phillips TD, Corrier DE and Hueff W. Domination of aflatoxicosis in growing chickens by the dietary addition of hydrated sodium calcium aluminosilicate. Poul. Sci. 1990; 69: 727-735.
- Kubena LF, Edrington TS, Kamps-Holtzapfel C, Harvey RB, Elissalde MH and Rottinghaus GE. Effects of feeding fumonisin B1 present in *Fusarium moniliforme* culture material and aflatoxin singly and in combination to turkey poults. Poul. Sci. 1995; 74: 1295-1303.
- Kubena LF, Edrington TS, Harvey RB, Buckley SA, Phillips TD, Rottinghaus GE and Caspers HH. Individual and combined effects of fumonisin b1 present in *Fusarium moniliforme* culture material and t-2 toxin or deoxynivalenol in broiler chicks. Poul. Sci. 1997; 76: 1239-1247.
- Kumar AA, Chand SK, Roa AT, Bisoi PC and Mishra PK. Clinicopathological changes in experimental aflatoxicosis in quail. Ind. J. Poul. Sci. 1993; 28(2): 150-153.
- Lanza GM, Washburn KW, Wyatt RD. Variation with age in response of broilers to aflatoxin. Poul. Sci. 1980; 59: 282-288.
- Larone, DH. Medically important fungi - A guide to identification, 3rd ed. ASM Press, Washington, D.C., 1995; 85-93.

Lastra MJ, Peralta AMA, Villamar AL. La producción de carnes en México y sus perspectivas 1990-2000” Centro de Estadística Agropecuaria SAGAR Mexico, 2000; 1-54.

Lawellin DW, Grant DW, and Joyce BK. Enzyme-linked immunosorbent analysis for aflatoxin B1. *Applied and Environmental Microbiology* 1977; 34:1 94-96.

Ledoux DR, Bermudez AJ, Fritsche KL and Rottinghaus GE. Effects of fumonisin B1 on selected immune responses in broiler chicks. *Poul. Sci.* 1999; 78: 1275-1282.

Ledoux DR, Brown TP, Weibking TS and Rottinghaus GE. Fumonisin toxicity in broiler chicks. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1992; 4: 330-333.

Lillehoj EB. Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. In *Aflatoxin and Aspergillus flavus* in corn, Southern Cooperative Series Bulletin 279 for Southern Regional Project S-132; Diener UL, Asquith RL, Dickens JW, Eds. Auburn University: Opelika AL 1983.

Luthy J, Zqefel U and Schlatter C. Metabolism and tissue distribution of ¹⁴C aflatoxin B₁ in pigs. *Food and Cosmet. Toxicol.* 1980; 18: 253-256.

Maggon KK, Gupta SK and Venkitasubramanian TA. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 1977; 41: 822-855.

Mayes PA. Metabolims of acylglycerols and sphingolipids in: Harper’s *Biochemistry*. Murray RK, Granner DK, Mayes PA and Rodwell VW. (eds). 21 ed. Appleton and Lange Norwalk, 1988; 218-225.

Medina-Martínez MS and Martínez AJ. Mold occurrence and aflatoxina B1 and fumonisin B1 determination in corn simples in Venezuela. *J. Agric. Chem.* 2000; 48: 2833-2836.

Méndez-Albores JA, Villa GA, Del Rio-García JC, Martinez EM. Aflatoxin-detoxification achieved with Mexican tradicional nixtamalization process (MTNP) is reversible. *J Sci Food Agri* 2004; 84:1611-1614.

Sweeney MJ, Dobson ADW. Review mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology* 1998; 43: 141–158

Mishra HN and Chitrangada D. A review on biological control and metabolism of aflatoxin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2003; 43: 245-264.

Moreno, M. E. El maíz y las aflatoxinas en: La industria de la masa y la tortilla: desarrollo y tecnología. Torres F, Chong I y Quintanilla J Eds PUAL-UNAM. 1996; 139-145.

Muller RD, Carlson CW, Semeniuk G and Harshfiel GS. The response of chicks, ducklings, goslings, pheasants and poults to graded levels of aflatoxin. *Poult. Sci.* 1970; 49: 1346-1350.

Murphy PA, Rices LG and Ross PF. Fumonisin B1, B2 and B3 content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *J. Agric. Food. Chem.* 1993; 41: 263-266.

Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 1992; 117: 29-36.

- Newberne PM. Chronic aflatoxicosis. Review. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1973; 163(11):1262-1267.
- OIE (World Organisation for Animal Health). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2004; [Internet] Available from: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00037.htm
- OMA Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL, 16th Edition Aflatoxin in Corn, Raw Peanuts, and Peanut Butter, Immunoaffinity Column Aflatest Method Aflatest P column, Vicam LP, 313 Pleasant Street, Watertown, MA 02472 USA 1999.
- Osborne DJ, Huff WE, Hamilton PB and Burtmeister HR. Comparasion of ochratoxin, aflatoxina and T-2 toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific metabolism of carotenoids in chickens. Poult. Sci. 1982; 61: 1646-1652.
- Oswellier GD, Carson TL, Buck WB and VanGelder GA. Clinical and diagnostic. Vet. Toxic. 3rd ed Kendall/Hunt, Iowa, 1985; 409-450.
- Patterson DSP, and Roberts BA. The formation of aflatoxins B2a and G2a and their degradation products during the vitro detoxification of aflatoxin by liver of certain avian and mammalian species. Fd. Cosmet. Toxicol. 1970; 8: 527-538.
- Perozo MF, Rivera S, Finol G and Mavárez Y. Aflatoxina B1, selenio y *Saccharomyces cerevisiae* en la respuesta inmune del pollos de engorda en el Estado de Zulia, Venezuela. Rev Científica, FCV-LUZ 2003; 5: 360-370.
- Pier AC and McLoughlin ME. Mycotoxic suppression of immunity. In: Trichothecens and Other Mycotoxins. Lacey J Eds Wiley and Sons, Chichester, 1985; 507-519.
- Pitt JI, Hocking AD, Bhudhasamai K, Miscamble BF, Wheeler KA, and Tanboon-Ek P. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2. Beans, rice, small grains and other commodities. International Journal of Food Microbiology. 1994; 23:35-43
- Placinta CM, D'Mello JPF and Macdonald AMC. A review of worldwidw contamination of cereal grains and animal feed with mycotoxins. Animal Feed Science and Technology 1999; 8: 21-37.
- Prathapkumar H and Bhat RV. Natural occurrence of fumonisin B1 and its co-occurrence with aflatoxin B1 in indian sorghum, maize and poultry feeds. J. Agric. Food Chem. 1997; 45: 2170 -2173.
- Quezada TT, Cúellar PLH, Martínez AA, Valdivia FA y Rebollar SE. Secuencia de los efectos de la aflatoxina B1 sobre el riñón e hígado de pollos en desarrollo. XVIII Convención nacional ANECA, Cancún, Quintana Roo, México, 1993; 226-231.
- Quist CF, Bounous DI, Kilburn JV, Nettles VF, Wyatt RD. The effect of dietary aflatoxin on wild turkey poults. J Wildl Dis. 2000; 1 36(3):436-44.
- Ramesh V, Bhat y Vasanthi S. Tercera Conferencia Internacional FAO/OMS/PMA sobre micotoxinas (MYC-CONF/99/4^a), Túnez, Túnez, 1999; 1-13

Rao VN and Joshi HC. Effect of certain drugs on acute induced aflatoxicosis in chicken (4 mg aflatoxina B1/kg bwt). Indian vet. J. 1993; 70: 344-347.

Raper KB, and Fennell DI. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore 1965.

Real Academia Española, Diccionario de la Lengua Española Vigésima segunda edición Espasa Calpe, S.A. España 2003. ISBN: 84-239-6814-6.

Robledo ML, Marín S y Ramos AJ. Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y grano de café verde en el estado de Nayarit (México). Rev Iberoam Mycol 2001; 18: 141-144.

Rosiles MR, Garcia MT y Ross FP. Confirmación fisicoquímica de la Fumonisina B1 en maíz y alimento para equinos que murieron por leucoencefalomalacia. Vet Mex 1996; 27: 111-113.

Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Osweiler GD, Rice LG, Plattner RD and Wilson TM. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolate associated whit equine leucoencephalomalacia and pulmonary edem syndrome in swine. Appl. Environ. Microbiol. 1990; 56: 3224-3226.

Sawhney DS, Vadehra DV and Baker RC. The metabolism of 14C aflatoxins in laying hens. Poult. Sci. 1973; 52: 1302-1309.

Schaffer J, Tyczkowski JK and Hamilton PB. Depletion of owycarotenoid pigments in chickens and the failure of aflatoxina to alter it. Poult. Sci. 1988; 67: 1080-1088.

Shank RC. Mycotoxins: Assesment of risk mycotoxins and N-nitrosocompounds: Environmental Risk. Volume I, Shank RC (Eds.). CRC Press, INC Boca Raton, Fl. 1981; 141-154.

Smith JW, Hamilton PB. Aflatoxicosis in the broiler chicken. Poult Sci. 1970; 49(1):207-215.

Smith JE and Ross K, The toxigenic *Aspergilli*, in: Mycotoxins and Animal Foods. Smith JE and Henderson RS (eds). Boca Raton, CRC Press, 1991; 101-118.

Soriano JM, González L and Catalá AI. Mechanims of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. Prog Lipid Res. 2005; 44: 345-356

Sutton DA, Fothergill AW and Rinaldi MG. guide to clinically significant fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1998.

Townsend CA, Christensen SB and Trauwein K. Hexanoate as a starter unit in polyketide synthesis. J. Amer. Chem. Soc. 1984; 106: 3868-3869.

Tung HT, Cook RD, Wyatt PB and Hamilton PB. The anemia caused by aflatoxina. Poultry Sci. 1975; 54: 1962-1969.

Trucksess MW, Stoloff L, Young K, Wyatt RD and Miller BL. Aflatoxicol and aflatoxins B1 and M1 in eggs and tissues of laying hens consuming aflatoxin-contaminated feed. Poult. Sci. 1983; 62: 2176-2182.

Tyczkowski JK and Hamilton PB. Altered metabolism of carotenoids during aflatoxicosis in young chickens. *Poult. Sci.* 1987; 66: 1184-1188.

Viquez OM, Castell-Perez ME and Shelby RA. Occurrence fumonisin B1 in maize grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.* 1996; 44: 2789-2791.

Virdi JS, Tiwari RP, Saxena M, Khanna V, Singh G, Saini SS, Vadehra DV. Effects of aflatoxin on the immune system of the chick. *J Appl Toxicol.* 1989; 9(4): 271-275.

Visconti A, Marasa WFO, Millar JD and Riley R. Tercera conferencia internacional mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. *Micotoxinas de interés creciente.* Túnez, Túnez, 1999.

Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT and Merrill A.H. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisin. *J. Biol. Chem.* 1991; 266: 14486-14490.

Weibking TS, Ledoux DR, Bermúdez AJ, Turk JR and Rottinghas GE. Effects of Feeding *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 on the young broiler chick. *Poult Sci.* 1993; 72: 456-466.

Wicklow DT, Horn BW, Shotwell OL, Hesseltine CW and Caldwell RW. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grown in a controlled environment. *Phytopathol.* 1988; 78: 68.

Wong ZA and Hsieh DPH. The comparative metabolism and toxicokinetics of aflatoxin B1 in the monkey, rat and mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1980; 55: 115-125.

Yoshisawa H, Uchimar R, Kamataki T, Kato R and Ueno Y. Metabolism and activation of aflatoxin B1 by reconstituted cytochrome P-450 system of rat liver. *Cancer Res.* 1982; 23: 1120-1124.