



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**

---

---

**Determinación del efecto en el tejido intestinal de conejos  
por (AFB<sub>1</sub>), evidenciado por Microscopía Electrónica.**

TESIS  
PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTAN  
PALACIOS OLIVAR FABIAN; RAMIREZ CARDENAS ITZELL ALEYDA.

Asesor: MVZ. MSC. PHD. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN.

Cuautitlán Izcalli  
2010





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

Con base en el Art. 19 del Reglamento General de Exámenes, la Dirección de la Facultad, autoriza al alumno:

Fabián Palacios Olivares

con número de cuenta: 30122158-0, a presentar

La tesis: Determinación del efecto en el tejido intestinal de conejos por (AFB1), evidenciado por Microscopía Electrónica.

Bajo la Asesoría del: Dr. Eliseo Manuel Hernández Baumgarten

para obtener el TITULO de: Químico Farmacéutico Biólogo

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA Y FECHA DE RECIBIDO
PRESIDENTE	<u>Dr. Eliseo Manuel Hernández Baumgarten</u>	<u>[Firma]</u> 31-Ago-10
VOCAL	<u>Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira</u>	<u>[Firma]</u> 31-Ago-10
SECRETARIO	<u>MVZ. Gabriela Fuentes Cervantes</u>	<u>[Firma]</u> 31-Ago-10
1er. SUPLENTE	<u>Dr. Enrique Salas Téllez</u>	<u>[Firma]</u> 31-Ago-10
2° SUPLENTE	<u>Dra. Alma Lucila Núñez del Arco</u>	<u>[Firma]</u> 31-Ago-10
* Lo Sustituye	_____	_____
** Lo Sustituye	_____	_____

Atentamente notificamos su participación para la revisión y evaluación, solicitando firme la presente al recibir copia del trabajo y en un plazo no mayor de 20 días hábiles, emita sus observaciones y/o su VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 30 de Agosto del 2010

[Firma]  
Lic. Araceli Herrera Hernández  
JEFE DEL DEPARTAMENTO

NOTA: Los Sinodales Sustitutos están obligados a presentarse el día y hora del Examen  
AHH/rhr Profesional (Art. 129) DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

Recibido  
21/8/2010  
Recibido  
Recibido



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

Con base en el Art. 19 del Reglamento General de Exámenes, la Dirección de la Facultad, autoriza al alumno:

Itzell Aleyda Ramírez Cárdenas

con número de cuenta: 40508998-7 a presentar

La tesis: Determinación del efecto en el tejido intestinal de conejos por (AFB1) evidenciado por Microscopía Electrónica.

Bajo la Asesoría del: Dr. Eliseo Manuel Hernández Baumgarten

para obtener el TITULO de: Química Farmacéutica Bióloga

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

Table with columns: CARGO, NOMBRE, FIRMA Y FECHA DE RECIBIDO. Rows include PRESIDENTE, VOCAL, SECRETARIO, 1er. SUPLENTE, 2º SUPLENTE, and two rows for substitutes (\* Lo Sustituye, \*\* Lo Sustituye).

Atentamente notificamos su participación para la revisión y evaluación, solicitando firme la presente al recibir copia del trabajo y en un plazo no mayor de 20 días hábiles, emita sus observaciones y/o su VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
POR MI RAZA HABLARA EL CASTELLANO
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Agosto del 2010

Lic. Araceli Herrera Hernández
JEFE DEL DEPARTAMENTO

NOTA: Los Sinodales Suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (Art. 120)

Recibido 21/12/2010 Ramirez

## **Dedicatorias**

Este trabajo está enteramente dedicado a todas las personas que ayudaron y lograron que esta labor fuera posible.

### **A mis papas:**

A mi papa gracias por ese microscopio de la infancia que marco mi vida y por heredarme ese gusto por la ciencia. A mi mama por mostrarme que el trabajo duro y la constancia hacen posible todo y que nada es imposible.

### **A mi hermano:**

Por enseñarme que la amistad es un bien preciado y que fue su ejemplo el que me hizo crecer y querer ser alguien.

### **A mi novia:**

A Aleyda por estar a mi lado por ser mi amiga por quererme, por ser la fuente de mi inspiración y por que sin ti esto no sería posible.

### **A mi familia:**

A mis tíos, tías, primos y primas por estar a mi lado.

### **A mis amigos:**

A Carlos, Phillipe, Cristian, Myrra, Erika, Mirthala, Edith, Julio, Charly, Javier, Javito, Beto, Galvan, Mauricio, Aline, Miguel, Roro, Hayde, Jessica, Fernando, Edgar y Guillermo.

**Fabián Palacios Olivar**

## **El presente trabajo y todo el esfuerzo que este conlleva lo dedico a:**

**Mi mamá** Yolanda por ser ejemplo de superación y ambición, por inculcarme los principios y valores que ahora y siempre me harán llegar y sobrepasar mis metas, por su apoyo, desvelos y preocupaciones de siempre pero sobre todo durante mi etapa de estudiante. Mamá te amo, gracias por ser uno de los dos pilares más fuertes sobre los que erijo mi vida.

Una de las personas que más admiro por su manera de luchar ante la vida, **mi papá** Armando, gracias por los momentos y también por el regalo más grande que pudiste darme los valores y principios mas importantes como la honestidad, la lealtad y la responsabilidad sobre los que pienso llevar mi profesión y vida. Papá te amo, gracias por ser el otro pilar tan fuerte y grande sobre el que erijo mi vida.

Papás las palabras en esta página no serán suficientes para expresar el agradecimiento que les tengo por ser parte de mí y por tanto de este trabajo, gracias por ayudarme a ser lo que ahora soy y enseñarme a luchar con todo porque algún día será gratificado.

**Mi hermana** Viviana por su constante apoyo, por alimentar mis ilusiones, por estar presente. Vivis te amo eres la mejor hermana que pude tener para lograr este triunfo y por eso te lo dedico y comparto, gracias por inyectarme ese ánimo que tu le inyectas a tu vida.

**Mis sobrinos** Leander y Naylea por su sincera confianza.

**Mi abuelita** Otilia y **mi tío** Francisco por haber confiado siempre en mí, por su compañía, por su apoyo incondicional, por estar siempre conmigo....Abuelita, tío los amo por enseñarme a ser fuerte...Abuelita...por ti.

**A mi novio** Fabián por ser mi apoyo, mi fuerza en tiempos de flaqueza, mi peso cuando he querido volar de más, por compartir mis alegrías y mis tristezas, por ser esa persona especial que me hace especial y única, por ser mi compañerito de bacter!!, por esto y todo lo demás te dedico este trabajo por ser tu el impulso que me ha llevado de la mano hasta este lugar. Te amo manguito.

**A mis amigos y compañeros**, más que de escuela, de vida, les agradezco sus presencias y sus necesarias ausencias también, gracias por todos esos momentos compartidos que me han hecho aprender y crecer también...

Gracias a todos ustedes por ser la fuerza que impulsa mi vida. No olviden siempre SONREIR!

**Itzell Aleyda Ramírez Cárdenas**

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darnos la oportunidad de formarnos en sus aulas, por estar en ellas, por brindarnos el mejor de los regalos que es la educación, por darnos no una escuela si no un hogar.

Una de las personas más interesadas en enseñarnos todo lo que sabe, primero nuestro maestro después nuestro amigo y guía Dr. Eliseo Hernández Baumgarten, gracias por todo este tiempo y por la valiosa oportunidad de haberlo conocido y haber colaborado con usted en este trabajo.

Al Dr. Juan Carlos del Río García, académico de la FES-Cuautitlán- campo 4, UNAM que pertenece a la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM); Por su apoyo, paciencia, conocimientos, asesoría técnica y ayuda incondicional, le estamos infinitamente agradecidos.

Gracias por su ayuda, por su contribución, pero sobre todo por su tiempo y confianza:

Dr. Crisóforo Mercado, responsable de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de Campo 4, FESC-UNAM, por brindarnos un lugar en estas magnificas instalaciones y por ser siempre un apoyo.

MVZ. Yolanda Romero S. del Depto. De Ciencias Biológicas, Sección Ciencias de la Salud Animal FESC-UNAM, gracias por su ayuda en el procesamiento de las muestras para Histología.

MC. Sofía González, QFB. María Rosario Ruíz, Sr. Rodolfo Robles Gómez, Laboratorio de Microscopia Electrónica. FES-Cuautitlán-UNAM, por su colaboración para el estudio por Microscopia Electrónica.

Dra. Susana E. Mendoza, MVZ. David Trujillo, Laboratorio de Virología, FES-Cuautitlán-UNAM, por permitirnos conocerlos y brindarnos su valiosa ayuda.

Jefe de Laboratorio Dr. César Flores, MC Rafael Quintanar, UBIPRO, FES-Iztacala, por el tiempo, pero sobre todo por apoyarnos en el estudio de las muestras por Microscopía Electrónica .

Dra. Araceli Patrón y al MC. Gabriel Orozco Hoyuela del Laboratorio de Fisiología Celular, UNAM, Ciudad Universitaria por su apoyo en el estudio de las muestras por Microscopia Confocal.

Agradecemos a todo el personal que con una sonrisa o con un consejo, lograron ser parte de este logro, por eso y más les estamos en deuda.

A todos muchas gracias sobre todo por su AMISTAD...

## INDICE GENERAL

### Pagina

RESUMEN

INDICE DE CUADROS, GRAFICAS Y FIGURAS

INDICE DE ABREVIATURAS

CAPITULO 1. INTRODUCCION

1.1	Micotoxinas.....	1
1.2	Conejos.....	4
1.3	Aparato digestivo del conejo.....	5
1.4	Cunicultura en México.....	8
1.5	Microscopia Optica.....	12
1.6	Microscopia Electrónica de Barrido.....	14
1.7	Microscopia Confocal.....	17

CAPITULO 2. OBJETIVOS

2.1	Hipótesis.....	20
2.2	Justificación.....	20
2.3	Objetivos generales y particulares.....	21

CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

3.1	Materiales y métodos	
3.1.1	Animales Experimentales.....	22
3.1.2	Alimento.....	23
3.1.3	Estudios Patológicos.....	24
3.1.4	Método Estadístico.....	24

CAPITULO 4. RESULTADOS..... 25

CAPITULO 5. DISCUSION..... 34

CAPITULO 6. CONCLUSIONES..... 43

BIBLIOGRAFIA..... 44

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en Cuautitlan Izcalli, Estado de Mexico en las instalaciones de la FES-Cuautitlan UNAM, en el transcurso del presente año. El propósito de este trabajo consistió en la evaluación del daño que causan las AF en el intestino del conejo (lagomorfos), mediante la obtención y observación de muestras, provenientes de conejos alimentados de *pelets* contaminados con AFB<sub>1</sub>, empleando Microscopia Óptica, Microscopia Electrónica de Barrido y Microscopia Confocal, lo que podría ayudar a evidenciar lesiones causadas en el sistema digestivo del conejo por la presencia de las mismas. En muchos países al igual que en México, la reproducción de conejo representa una gran actividad económica en muchas regiones y estados del país y ya que se han encontrado pocos estudios del efecto de las aflatoxinas sobre los conejos y debido a que los animales que han sido alimentados con *pelets* contaminados pierden peso aun que el intestino es un órgano que en la histopatología siempre se ha encontrado sin cambio patológico aparente. La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), está entre los más potentes carcinógenos conocidos. Su acción carcinógena se basa en la biotransformación por el sistema hepático microsomal P450 a AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxido, un intermediario altamente reactivo capaz de unirse a las proteínas. Los efectos tóxicos de las AF comúnmente observados en los animales incluyen desde mala absorción de nutrimentos hasta la muerte del animal. Se alimentaron por 21 días, diez conejos variedad Nueva Zelanda con *pelets* contaminados con 610ppb de AFB<sub>1</sub>, para la determinación de esta concentración se utiliza la técnica de Aflatest®, posteriormente se dio muerte a los conejos, las muestras tomadas durante la necropsia fueron tratadas para poder ser observadas bajo diferentes técnicas de microscopia. El estudio mostro evidencia significativa de las consecuencias que provocan el consumo de Aflatoxinas sobre el tejido intestinal, un paso en la búsqueda de resultados que puedan plantear a productores nacionales y extranjeros, investigadores y autoridades una prueba de las consecuencias que trae consigo la contaminación del alimento por AF, no solo para uso animal sino también por el impacto que tienen estos animales, ya que en muchas comunidades de diferentes países son una base para la alimentación de muchas personas y esto por supuesto habla, de un posible riesgo a la salud humana si se consumen animales expuestos a estas toxinas.

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

*FIG. 1. Diagrama del Microscopio Electrónico de Barrido*

*FIG. 2. Microscopio Confocal*

*FIG. 3. Diagrama del Microscopio Confocal*

*FIG. 4. Perfiles de espectro del Microscopio Confocal*

*FIG. 5. Jaulas para conejo*

*FIG. 6. Conejos Nueva Zelanda*

*FIG. 7. Intestino de conejo en MO*

*FIG. 8. Duodeno de conejo en MEB*

*FIG. 9. Yeyuno de conejo en MEB*

*FIG. 10. Íleon de conejo en MEB*

*FIG. 11. Intestino de conejo en MC*

*CUADRO 1. Contenido de Aflatoxinas (ppb) en alimento contaminado por A. flavus.*

*CUADRO 2. Ganancia de peso y consumo de alimento de tratamientos 1 y 2.*

*CUADRO 3. Evidencia del daño en muestras de intestino por MO.*

*CUADRO 4. Evidencia del daño en muestras de intestino por MEB.*

*CUADRO 5. Toxicidad de la aflatoxina B1 (Dosis Letal  $LD_{50}$ ) en diferentes especies animales.*

*GRAFICA 1. Ganancia de peso de los no contaminados.*

*GRAFICA 2. Ganancia de peso de los contaminados.*

*GRAFICA 3. Ganancia de peso con mínimos cuadrados de un conejo contaminado. Ejemplo del fenómeno de hormesis.*

## INDICE DE ABREVIATURAS

AF	Aflatoxinas
AFB <sub>1</sub>	Alatoxina B1
cc.	Centímetros cúbicos
cm.	Centímetros
D	Dalton
DL <sub>50</sub>	Dosis Letal 50
FAO	Organización para la Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas.
FES-C	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Fig.	Figura
HPLC	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución
IARC	International Agency Research Cancer.
INEGI	Instituto Nacional de Información Estadística y Geográfica
Kg	Kilogramo
MC	Microscopio Confocal
MEB	Microscopio Electrónico de Barrido
MET	Microscopio Electrónico de Transmisión
ml	Mililitro
MO	Microscopio Optico
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
ppb.	Partes por billón
SAG	Secretaria de Agricultura y Ganadería
SOM	Sistema de Oxidasas Múltiple
ssp.	Cualquier tipo
SSA	Secretaria de Salud
TGI	Tracto Gastro Intestinal
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria
µg	Microgramo

## **CAPITULO 1. INTRODUCCION.**

### **1.1 MICOTOXINAS.**

Las micotoxinas, son metabolitos secundarios generados por algunas variedades de hongos. Dichos metabolitos fúngicos, generan daño por: ingestión, inhalación o absorción cutánea. Probablemente las micotoxinas han ocasionado enfermedades desde que el hombre comenzó a cultivar plantas de forma sedentaria; ya que dichas sustancias se encuentran en una gran variedad de granos de gramíneas y otras semillas almacenadas. El estudio serio sobre las micotoxinas se inicio en los años sesenta después del descubrimiento de las aflatoxinas, desde entonces se han aislado por lo menos 300 metabolitos tóxicos de hongos de los cuales se han estudiado pocos (Hesseltine, 1979) se estima que hay por lo menos 23 tipos de envenenamiento por micotoxinas y por lo menos otras 25 enfermedades en animales y el humano en el que la causa es el consumo de micotoxinas. Las propiedades químicas, biológicas y toxicológicas son diversas. De ahí que sus efectos tóxicos sean extremadamente variables, dependiendo de la dosis, periodo de exposición, especie animal, edad, sexo y estado nutricional, efectos con otros químicos (Ellis WO et al 1991, Mishra HN 2006). Por otra parte el sinergismo de varias micotoxinas puede darse en tres formas: in interacción; interacción negativa y en la mayoría de los casos aumentando el efecto de cada una. Una sola cepa de *A. Flavus* es capaz de producir varios tipos de aflatoxinas de manera simultánea, así como otros hongos pueden producir varias micotoxinas simultáneamente con cepas de *Aspergillus spp.* presentes en alimentos y piensos (Galvano et al 2001). Alguno de estos hongos es contaminante inevitable de alimentos, según datos comunicados por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO).

Fue también en los años sesenta, cuando se descubrió que los metabolitos secundarios de los hongos *A. flavus* y *A. parasiticus* eran los responsables de la muerte de diferentes animales de granja. A estos metabolitos se les dio el nombre de aflatoxinas (AF) y se aislaron en esa década cuatro compuestos: B<sub>1</sub>,

G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> a los cuales se les determinaron sus propiedades fisicoquímicas y toxicidad. Desde entonces se han aislado por lo menos 18 compuestos diferentes de aflatoxinas (B<sub>2a</sub>, G<sub>2a</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, Aflatoxicol a y b, Q<sub>1</sub>, P<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, y otros) como productos metabólicos de sistemas microbianos y animales o producidos espontáneamente como respuesta al medio ambiente, aunque las cuatro primeras son las únicas aisladas en forma natural (Tejada 2009).

Según la NOM-188-SSA1-2002 las AF son los metabolitos secundarios producidos por varios mohos, cuya estructura química es heterocíclica, pertenecientes al grupo de las bisfurano cumarinas. Poseen toxicidad aguda y crónica, así como efectos mutagénicos y carcinogénicos en animales y el hombre.

Son estructuralmente un grupo diverso de compuestos con bajo peso molecular generalmente entre 300 a 400D producidos por géneros como: *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, *Penicillium spp.*, *Claviceps spp.* y *Alternaria spp.* (Steyn and Stander 1999).

Las AF son compuestos fluorescentes, altamente oxigenados, inodoras, insípidas e incoloras, químicamente estables en los alimentos y resistentes a la degradación bajo procedimientos de cocción normales son además compuestos heterocíclicos caracterizados por contener di hidrofuranos o tetrahidrofuranos unidos a una cumarina. La Aflatoxina B<sub>1</sub> es el más abundante en forma natural, muy tóxica y de alto poder cancerígeno (Pier, 1986, Leeson et al, 1995, Bhat, 1987, Wogan y Newberne, 1967).

Son producidas principalmente por los hongos *A. flavus* (AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, distinguiéndose por su color fluorecente bajo la luz ultravioleta B= Blue; G=Green, Ac ciclopiazónico, Ac, kojico,); *A. parasiticus* (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> y AFG<sub>2</sub>); *A. nomius* (AFB<sub>1</sub> y AFB<sub>2</sub>, Ac kojico). (Abarca et al, 2000).

La aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), está entre los más potentes carcinógenos conocidos. Su acción carcinógena se basa en la biotransformación por el sistema hepático microsomal P450 a A FB1-8,9-epoxido, un intermediario altamente reactivo

capaz de unirse a las proteínas, a los ácidos ribonucleicos y desoxirribonucleicos formando un compuesto estable con el N7 de los residuos guanil que puede causar, entre otros muchos efectos, mutaciones en el codón 249 del gen p53 supresor de tumores.

Esta alteración es característica de varios carcinomas, especialmente el carcinoma hepático humano. Estos metabolitos secundarios, son producidos cuando hay deficiencia de nutrientes esenciales o cuando el crecimiento del hongo termina y los procesos de síntesis del mismo se encaminan hacia la producción de pigmentos, antibióticos o micotoxinas. (Díaz 1996).

Las AF de la serie 1 son en general mucho más tóxicas que las de la serie 2. La AFB<sub>1</sub> ha sido clasificado en el grupo 1 por la IARC (*International Agency Research Cancer*) como carcinógeno cuyo principal órgano blanco es el Hígado (International Agency for Research on Cancer 2002).

Los efectos tóxicos de las AF comúnmente observados en los animales incluyen desde mala absorción de nutrientes hasta la muerte del animal, integridad tisular reducida, fragilidad capilar, tasas de crecimiento menores y malas conversiones alimenticias, disminución de la respuesta inmune (fallas vacunales), problemas reproductivos en hembras y machos, incremento en la sensibilidad a temperaturas extremas (Davegowda y Munthy 2005, Leeson et al 1995). Wogan y Newberne (1967) probaron desde hace más de 40 años la carcinogenicidad de la AFB<sub>1</sub> en animales de laboratorio, confirmando los efectos tóxicos de las mismas.

El destino de una micotoxina en el cuerpo animal depende de la cantidad y velocidad de absorción del tracto gastrointestinal (TGI), su distribución su unión o localización en tejidos, los procesos de biotransformación y excreción. La toxicocinética y la toxicodinamia de una toxina, esta determinada por las propiedades físicas del compuesto y por la interacción con los tejidos responsables de su eliminación (Galtier, 2003)

Dentro de las AF existe una clasificación que estipula cuales son de baja o de alta toxicidad para el caso de las micotoxinas de alta toxicidad se menciona que la LD<sub>50</sub> oral menor a 10 mg/kg de peso corporal de ratón, incluyendo penitrem, AFB<sub>1</sub>, toxina T2, ocratoxina A, diacetoxiscirpenol y fusarenon X son AF de alto riesgo animal y humano (Galtier, 2003).

Por el otro lado los efectos a largo plazo de micotoxinas como mutágenos y carcinógenos han sido ampliamente estudiados, de esta manera AFB<sub>1</sub> ha sido clasificada como cancerígena en humanos (grupo 1).

## **1.2 CONEJOS.**

El conejo es un mamífero que pertenece a la familia de los lepóridos como las liebres que puede ser domestico o silvestre, se clasificaban antes entre los roedores, por la prominencia de sus incisivos se les llamaba duplicidentados (dos incisivos) para distinguirlos de los otros roedores (unicidentados), actualmente lo forman con los lagomys un orden nuevo, llamado los lagomorfos.

El conejo es uno de los animales preferidos en los estudios zootécnicos, ya que en la explotación pecuaria se observa una discreta tendencia de los criadores en incrementar la explotación de animales de medio y pequeño porte como suinos, aves, conejos, etc., intentando aumentar la producción de bienes de consumo, debido a que estas especies no necesitan de gran espacio físico.

El conejo silvestre es originario de la Península Iberica alcanza 40 cm de largo y puede llegar a pesar más de 1.5 kg. su pelo varia del marron claro al gris, posee dos largas orejas orientables, su labio superior esta partido (labio leporino) y sus miembros posteriores adaptados para el salto. Muy gregario vive en madrigueras cavadas en terrenos arenosos y arbolados; La hembra es muy prolifera tras unos treinta días de gestación pare de tres a cuatro camadas anuales y de cuatro a diez gazapos por cada una.

El conejo ha evolucionado en el Mediterraneo Occidental y en otras latitudes debido a la introducción de esta especie a través de los colonos europeos que

se instalaron en países lejanos en los siglos XVIII y XIX aunque no de muy buena manera y con consecuencias no esperadas. Es en este sentido se puede considerar a Australia, como el caso más devastador al introducir una especie como el conejo a un hábitat diferente y generando un difícil problema ecológico al disiparse de manera importante la población de conejos silvestres dañando a la flora y fauna nativa.

Los conejos son animales bien adaptados a su medio aunque anatómicamente no estén bien dotados para la excavación, como otros animales, ellos viven en ciudades subterráneas que se comparten varias generaciones. Una adaptación muy importante es el lugar estratégico donde se encuentran sus ojos situación que le permite un campo de visibilidad sumamente amplio y orejas que se pueden calificar como periscópicas.

Se alimentan de toda clase de materiales vegetales, siendo extraordinariamente adaptable su dieta, su conducta social es altamente diferenciada, fuertemente territoriales marcan sus fronteras olorosamente, mediante la secreción de las glándulas submaxilares en una actitud y movimiento característico denominados “mentoneo”.

Por otro lado, el conejo es una especie utilizada como animal de experimentación debido a la facilidad en su manejo, principalmente relacionada a instalaciones y alimentación. Además de los aspectos zootécnicos que justifican la utilización de este animal, conviene resaltar su importancia para los morfólogos en la Anatomía Comparada y profesionales del área médica, especialmente para el estudio del comportamiento animal y efectos de medicamentos y otros estudios tóxicos.

### **1.3 APARATO DIGESTIVO DE LOS CONEJOS.**

El aparato digestivo de los conejos, inicia por su dentadura no presenta caninos, sus dientes no poseen raíz típica y son de crecimiento continuo, por lo que estos animales deben desgastarlos (permanentemente desgaste por la acción de roer); una lengua no prensil, el paladar duro y canales de las

glándulas salivales que abren en las mejillas. Hacia atrás se encuentra el paladar blando, la faringe, en cuyo fondo se abren el esófago y la laringe.

El esófago llega al estómago que es uno de los órganos voluminosos con capacidad de hasta 200cc y se caracteriza por tener una musculatura débil, por lo cual el conejo no vomita. Anatómicamente se distinguen dos sectores: la zona cardial o fundus, de paredes finas y que actúa como reservorio y el antro pilórico con mucosa glandular y paredes algo más gruesas posterior a el se conecta al duodeno por medio del píloro. El duodeno, de unos 10cm de longitud, contiene las aberturas del páncreas y el conducto biliar del hígado; ambas glándulas anexas del aparato digestivo que segregan el jugo pancreático y la bilis respectivamente. El duodeno se continúa con el yeyuno e íleon, quien se comunica con el ciego por medio de la válvula ileocecal. El ciego es un órgano grande que termina en un apéndice cecal que no es hueco y cumple una función de apoyo al sistema inmune. El ciego y el colon constituyen el intestino grueso del conejo. El ciego contiene una flora y fauna capaces de digerir la fibra y alimentos ricos en celulosa por medio de los protozoarios y bacterias contenidos en éste órgano. El tramo final del aparato digestivo es el recto, que termina en el esfínter anal.

Desde el punto de vista funcional, el conejo mastica sus alimentos finamente antes de ingerirlos, éstos ingresan al estómago y luego al intestino delgado en donde se digiere la proteína y carbohidratos de los granos que consume, y se absorben los azúcares y aminoácidos. La fibra ingresa sin digerir al ciego, en donde los microorganismos contenidos en él se encargan de la digestión de la celulosa y la formación de los cecótrofos que son ricos en proteína microbiana que el conejo consume directamente del ano. Éste proceso que caracteriza su fisiología digestiva se denomina "cecotrofia" y fue observado y descrito por primera vez por el Médico Veterinario francés Charles Morot en 1882. Otras especies que lo presentan son la liebre, el castor, el koala y los lemingos de Escandinavia. El proceso consiste básicamente en que a partir de residuos alimentarios que ya sufrieron una digestión gástrico-intestinal; en el ciego y colon se produce un tipo de excreta (cecótrofo) con características físico químicas distintas a las fecas propiamente dichas. Este cecótrofo es eliminado

con cierta ritmicidad y a partir de la tercera semana de vida, el animal lo ingiere directamente del ano sometiéndolo a un segundo proceso digestivo. Este proceso no debe confundirse con la coprofagia, ya que el conejo no ingiere las heces, sino el cecótrofo que por su contenido nutricional es considerado un alimento verdadero. Entonces ciego, cecotrofia y cecótrofo, constituyen respectivamente, el órgano, la función y el producto de síntesis de este complejo proceso que ha permitido al conejo lograr una alta eficiencia alimentaria.

El primer contacto de las AF es con los epitelios del aparato digestivo, y dado que el mayor daño en las intoxicaciones crónicas ocurre en el hígado, se ha pensado durante mucho tiempo que esto se debe a que es el órgano más importante en la detoxificación de las sustancias y tóxicos ingeridos. Esto crea el primer circuito dentro del aparato digestivo, debido a que el hígado segrega las AF en la bilis. El circuito es duodeno, hígado y bilis, con lo cual las AF dan una primera vuelta. En especial los lagomorfos como el conejo doméstico, digieren la fibra en el masivo ciego, como ya se ha dicho y al formar los cecótrofos, en los que las AF continúan activas, causan que se cierre el segundo círculo intestinal, ahora con el intestino delgado, ciego y por medio de los cecótrofos de vuelta a la cavidad oral.

La dosis letal de AF para los conejos se ha reportado como de dos miligramos por kilo de peso, lo cual corresponde a una de las más bajas de los animales domésticos. Los patitos de 11 días mueren con 3 miligramos por kilo de peso.

Esta alta susceptibilidad de los conejos a las AF, parece ser explicado por los dos circuitos digestivos mencionados antes.

Una de las técnicas para reducir la toxicidad de las AF, es el de agregarle adsorbentes como las tierras de diatomeas e incluso algunos minerales sintéticos, pero la gran interrogante que se presenta es que tan fuerte es la unión de las AF a los adsorbentes con esta doble pasada que le dan los conejos.

Como en muchos otros animales, los conejos jóvenes son más susceptibles que los adultos, y cantidades tan bajas como 2 ppb pueden causar problemas clínicos a animales de recién destete.

#### **1.4 CUNICULTURA EN MEXICO.**

En México, los historiadores reportan que los conquistadores encontraron conejos en suelo americano, los cuales eran llamados *tochtli* por los mexicas. Algunos cronistas cuentan que este animal era parte importante en las ofrendas que brindaban a los dioses como Quetzalcoatl y que eran muy apreciados por nuestros antepasados no sólo por su carne sino también por su piel que era utilizada en la fabricación de mantas y muchas otras prendas de vestir las cuales eran ofrecidas en los mercados. Existen relatos que cuentan que el emperador Moctezuma tenía cocineros que preparaban deliciosos platillos muy variados a base de carne de conejo. En los calendarios Azteca y Tolteca el conejo representaba la entrada de un nuevo ciclo del año y a la tierra como elemento al ser un punto cardinal y una de las cuatro estaciones. Fue utilizado en muchos rituales místicos y formaba parte de las constelaciones; de acuerdo a sus creencias los nacidos bajo el signo *Ce tochtli* (un conejo), serían muy afortunados y prósperos pues llegarían a ser grandes trabajadores, buenos granjeros y aprovechadores del tiempo.

En épocas modernas, la explotación del conejo se vio afectada por otras especies más populares como los bovinos, los cerdos y las aves, y fue recién a principios de este siglo, debido a la escasez de alimento a causa de las guerras que azotaron a la humanidad, en que se pensó en su cría a nivel productivo.

La cunicultura es el proceso de cría, engorda y reproducción de los conejos en forma económica para obtener el máximo beneficio en la venta de sus productos y subproductos. El conejo, es un animal herbívoro que conserva la habilidad de balancear su dieta y por lo tanto puede alimentarse en forma barata con plantas de la región. Debido a esto puede aportar a las familias que se dedican a su cría grandes beneficios económicos.

En nuestro país, es a partir de 1970 cuando esta especie es promovida con gran intensidad con la finalidad de ofrecer al pueblo, sobre todo en las zonas marginadas, una opción más barata de proteína animal obteniendo así una mejor alimentación. Se crearon centros de fomento cunícola en San Luis Potosí, Colima, Tlaxcala e Irapuato, con la finalidad de proveer de animales de calidad y dar capacitación a los productores.

Estos programas tuvieron éxito en un comienzo, pero diversos motivos como la falta de información y las costumbres muy arraigadas en la población, provocaron primero un descenso en la producción y un estancamiento en los años siguientes. Las estadísticas ganaderas muestran que hasta el año 1986 solamente se mantuvieron muy pocas granjas productivas en el país. A partir de esa época empezó nuevamente a surgir el interés por la especie lo que se reflejó en un notorio incremento de la producción y sobre todo en el consumo. Este último aumentó de forma tan importante que la producción no fue suficiente y los principales expendedores del país tuvieron que recurrir a importar carne de conejo procedente de China. Con los canales de importación se introdujo en 1988 la Enfermedad Hemorrágica Viral de los conejos que causó grandes pérdidas en las granjas cunícolas nacionales. Comenzó en el país una etapa de lucha contra la enfermedad y en enero de 1991 se declaró al país libre de ella comenzando un período de repoblación. A raíz de este problema la cunicultura experimentó cambios importantes y se le ha dado un nuevo impulso. Se ha creado la Comisión Nacional de Rescate de la Cunicultura con la colaboración de la Confederación Nacional Ganadera, de la Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural, y de los fabricantes de alimentos y de implementos para la cunicultura.

En el país se explotan, en la actualidad, aproximadamente 10 razas de conejos, entre ellas Nueva Zelanda Blanco, California, Chinchilla, Satinado, Rex, Negro Azteca, Gigante de Flandes, Holandés y algunas razas enanas. En la producción de traspatio se crían frecuentemente conejos criollos con buenos resultados. La mayor parte de estas razas se utiliza para producción de carne.

Actualmente la estructura de esta actividad se encuentra en transformación, pasando de una actividad netamente de subsistencia a un tipo comercial y aunque no se cuenta con cifras estadísticas oficiales, se estima que actualmente se producen entre 10,000 y 15,000 toneladas anuales de carne de conejo, lo cual se sustenta en información de los fabricantes de alimentos balanceados que reportan un considerable incremento en la demanda de sus productos especializados para esta especie, asimismo, las organizaciones de productores han manifestado un incremento en el número de sus asociados, así como una mayor tecnificación de la infraestructura productiva, lo que les ha permitido mejorar sus parámetros productivos e incrementar la productividad de la especie.

#### *La cunicultura en el contexto nacional.*

Los pueblos prehispánicos comercializaban vivo y muerto el lagomorfo silvestre (*Sylvilagus spp.*) para ser consumido en una gran variedad de platillos. Hoy en nuestros días es una especie de gran importancia cinegética, pues su carne es muy apreciada en las zonas rurales de nuestro país (Climent, 1977).

Durante la década de los setentas el gobierno federal mexicano impulsó la producción de conejos para carne, autorizando y financiando la construcción del Centro Nacional de Cunicultura en Irapuato, Guanajuato. La Secretaría de Agricultura y Ganadería (SAG) desarrolló un programa de paquetes familiares para promover la producción y consumo de carne con el conejo a nivel nacional. Al inicio de los años ochenta en esta actividad se repitió el fenómeno observado en ciertos países de Europa; allá recibió el apodo de “la industria de los 18 meses” en referencia a la duración de la actividad entre la mayoría de la gente que se iniciaba en el negocio. Aquí la falta de experiencia, la creencia de que la cunicultura es una actividad fácil, la desleal comercialización de pío de cría, equipo o alimentos, la escasa cultura social respecto al consumo de carne de conejo y la falta de investigación para el desarrollo fueron los elementos que impidieron su expansión a mayor escala. (Colin y Lebas 1992)

Al finalizar la década de los ochenta en México, la presencia de la enfermedad hemorrágica viral de los conejos reveló la gran importancia de la producción de

carne de conejo. Esta enfermedad tuvo grandes efectos, muchos perjudiciales, muchos favorables, en el municipio de Ecatepec, Estado de México se conoció el primer reporte oficial de la enfermedad, razón para que La Comisión Americana para la Erradicación de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas iniciara una exitosa campaña de erradicación en quince estados de la República que fueron afectados, sacrificando un número aproximado de 170,000 conejos, cifra que significó un 20 % del inventario nacional. Los cunicultores fueron indemnizados y algunos meses más tarde se repoblaron los criaderos.

#### *La cunicultura en el Estado de México.*

INEGI (1989) estima que el número de unidades de producción rural con actividad de cría y explotación de animales en el Estado de México alcanza una cifra de 222,597, de éstas, 22,048 (el 9.9 %) tienen más de 5 hectáreas y 200,549 (el 90.1 %) tienen menos de 5 hectáreas. Específicamente existen 12,607 unidades de producción rural con conejos y colmenas de las que 1,878 (el 14 %) se ubican en predios con más de 5 hectáreas y 10,729 (el 85 %) se ubican en predios con menos de 5 hectáreas. Desafortunadamente no se tienen datos actualizados, solo se sabe que puede ser considerado desde 1980 como el primer productor de conejos a nivel nacional, el mayor dinamismo se tiene en los municipios conurbados con el Distrito Federal, como Texcoco, Ecatepec, Cuautitlán, Cd. Nezahualcoyotl, Chimalhuacan, Chalco, Ixtapaluca, en los municipios del norte del Estado, como Atlacomulco, El Oro, Temascalcingo, Jocotitlan, Ixtlahuaca y en los denominados corredores gastronómicos como la Marquesa y Tenancingo. En 1998 El gobierno del estado promovió un programa de paquetes familiares compuestos por tres hembras y un macho, logrando colocar alrededor de 35,000 conejos entre un amplio sector rural y urbano; cifras de 1999 de La Secretaría de Desarrollo Económico del gobierno estatal, estiman una producción de 3,500 toneladas de carne con una proyección en ascenso para los próximos años. (Gobierno del Estado de México, 1999)

Desde 1970, año en que se inicia oficialmente la producción de conejos en nuestro país, la secretaría del gobierno federal encargada del fomento agropecuario la había promovido como una actividad de subsistencia sin mayor importancia económica.

La cunicultura en México es una actividad familiar y comercial que se encuentra al margen de los avances de la genética, nutrición, reproducción, patología y mercadotecnia; sin embargo, está presente como una fuente real de ingresos adicionales para muchas familias (Climent 1977, Templeton 1982).

El censo agropecuario de 1991 no contempló el inventario de esta especie por estar en fase de eradicación de la Enfermedad Hemorrágica Viral de los Conejos y los datos que sugiere el INEGI en el municipio en estudio es necesario confirmarlos.

El estudio de la aflatoxicosis en conejos tiene importancia debido precisamente al pequeño tamaño de las granjas dedicadas a la cunicultura. La limitación de terreno les impide producir su propio alimento, y por lo tanto están obligados a adquirir y almacenar alimentos balanceados. En el altiplano, en donde se ubican la mayor parte de las granjas, como ya quedó asentado, los almacenes de alimento no deberían guardar alimento para más de dos semanas, la época de lluvias en verano y las temperaturas cálidas del mismo favorecen el desarrollo de los *Aspergillus spp.* productores de aflatoxinas. Si la cantidad de AF es muy alto en los alimentos almacenados, puede ocurrir un brote de aflatoxicosis con alta mortalidad de animales de engorda recién destetados.

## **1.5 MICROSCOPIA OPTICA.**

El vocablo griego, *microscopio* proviene de micro- que significa: “tamaño pequeño” y de -scopio que es “observar”.

Un Microscopio Optico (MO) es un microscopio basado en lentes ópticas. También se le conoce como microscopio de luz, microscopio fotónico (que utiliza luz o "fotones") o microscopio de campo claro. El desarrollo de este

aparato suele asociarse con los trabajos de Anton Van Leeuwenhoek. Los microscopios de Leeuwenhoek constaban de una única lente pequeña y convexa, montada sobre una plancha, con un mecanismo para sujetar el material que se iba a examinar (la muestra o espécimen).

El MO se compone de dos sistemas ópticos: el objetivo que da una imagen aumentada del objeto observado y el ocular que permite aumentar dicha imagen. La potencia de un microscopio es la relación entre el ángulo, bajo el cual se vea la imagen observada, y la longitud del objeto.

El tipo de microscopio más utilizado es el microscopio óptico, que se sirve de la luz visible para crear una imagen aumentada del objeto. El MO más simple es la lente convexa doble con una distancia focal corta. Estas lentes pueden aumentar un objeto hasta 15 veces. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consiguen aumentos mayores. Algunos microscopios ópticos pueden aumentar un objeto por encima de las 2,000 veces.

El microscopio compuesto consiste en dos sistemas de lentes, el objetivo y el ocular, montados en extremos opuestos de un tubo cerrado. El objetivo está compuesto de varias lentes que crean una imagen real aumentada del objeto examinado. Las lentes de los microscopios están dispuestas de forma que el objetivo se encuentre en el punto focal del ocular. Cuando se mira a través del ocular se ve una imagen virtual aumentada de la imagen real. El aumento total del microscopio depende de las longitudes focales de los dos sistemas de lentes.

El equipamiento adicional de un microscopio consta de un armazón con un soporte que sostiene el material examinado y de un mecanismo que permite acercar y alejar el tubo para enfocar la muestra. Los especímenes o muestras que se examinan con un microscopio son transparentes y se observan con una luz que los atraviesa, y se suelen colocar sobre un rectángulo fino de vidrio. El soporte tiene un orificio por el que pasa la luz. Bajo el soporte se encuentra un espejo que refleja la luz para que atraviese el espécimen. El microscopio puede contar con una fuente de luz eléctrica que dirige la luz a través de la muestra.

## **1.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO.**

El primer microscopio electrónico fue diseñado por Ernst Ruska, Max Knoll y Jhener entre 1925 y 1930, quienes se basaron en los estudios de Louis-Victor de Broglie acerca de las propiedades ondulatorias de los electrones.

Existen por lo menos dos tipos de microscopio electrónico, con variaciones dentro de éstos dos tipos. El Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) y el Microscopio Electrónico de Barrido o Escandidor (MEB)

En cuanto a construcción, el MEB y el MO de campo claro presentan un diseño casi idéntico: sirve para aumentar la imagen de objetos pequeños invisibles a simple vista; las diferencias básicas entre ambos son que el electrónico usa un haz de electrones como fuente de iluminación, en tanto el óptico utiliza un haz de luz (incluyendo rayos ultravioleta) para ese propósito. Ambos sistemas cuentan con un condensador, una lente objetivo y un ocular o lente de proyección. El MO requiere de lentes de diferentes vidrios (Flint y Crown entre otros) para obtener las imágenes, en tanto que el MEB requiere de trabajar al alto vacío y cuenta con lentes magnéticas para la obtención de las imágenes. Las imágenes se obtienen en una placa fotográfica sensible a los electrones, o en microscopios más completos en una cámara digital.

El MEB es un instrumento comparable al microscopio de disección, en los que la luz o los electrones no tienen que pasar a través de la muestra, sino que se reflejan de la superficie. El MEB tiene la ventaja de que necesita muy poca preparación de las muestras. El barrido que hace el haz de electrones sobre la superficie de la muestra, es para evitar irradiar durante mucho tiempo una parte de la muestra. Las muestras biológicas que se van a estudiar en el MEB se necesitan cubrir con una delgada capa de oro para hacerlas electro-conductivas. La interacción de un haz de electrones con la muestra produce varios fenómenos: la emisión de electrones secundarios, la retrodispersión de los electrones y la emisión de radiaciones características de la muestra. Las muestras de minerales que son electro-conductivas sin necesidad de cubrirlas de oro, permite el análisis de elementos en la muestra, para las muestras biológicas que tienen algún mineral (Calcio o hierro, principalmente) se requiere

de un microscopio de bajo vacío, en el que los electrones en exceso de la muestra, se neutralizan por interacción con las moléculas de gas presentes en la cámara de la muestra. Los microscopios electrónicos permiten alcanzar resolución muy superior a los microscopios ópticos que son sus respectivas contrapartidas. El MO de campo claro alcanza una resolución de 0.2  $\mu\text{m}$ , en tanto que el MEB alcanza resoluciones de 1.5  $\text{\AA}$ ; una capacidad de resolución dos órdenes de magnitud mayor. El MEB procesa electrónicamente las imágenes, de tal manera que los electrones secundarios proceden de la superficie en estudio.

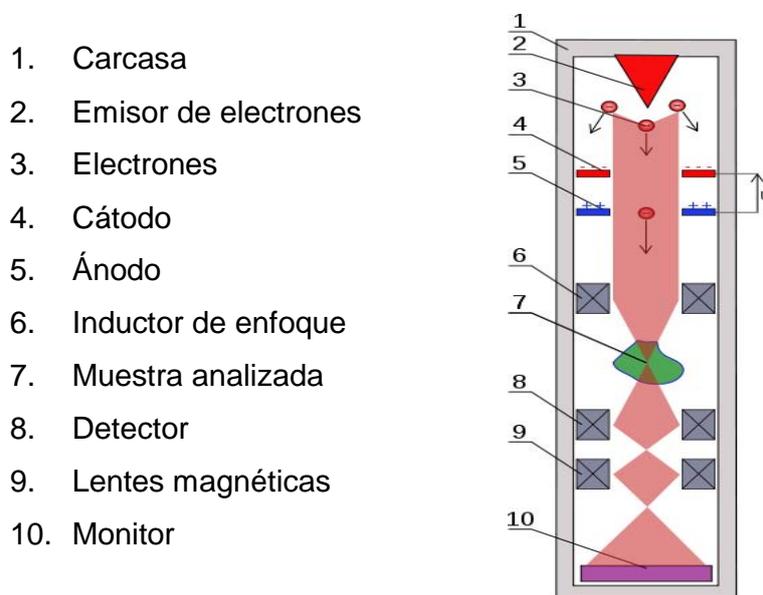
La limitación principal del MEB es la pobre resolución (<20 nm) y la imposibilidad de ver dentro de la muestra. Los electrones son captados por un detector que los atrae mediante una rejilla con carga negativa, son transformados en luz por el detector, incrementada ésta en un fotomultiplicador, y la imagen se ve proyectada en un tubo de vidicón y puede captarse en una cámara con negativo convencional o una cámara digital.

Para que una muestra pueda observarse en el MEB la muestra debe ser anhidra no solamente para que resistan el vacío, sino para que además puedan ser cubiertas con oro ionizado para hacerlas conductoras eléctricas. Un microscopio electrónico (Fig. 1), funciona con un haz de electrones generados por un cañón electrónico, acelerados por un alto voltaje y focalizados por medio de lentes magnéticas (todo ello al alto vacío ya que los electrones son absorbidos por el aire). Los electrones atraviesan la muestra (debidamente deshidratada) y la amplificación se produce por un conjunto de lentes magnéticas que forman una imagen sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones que transfiere la imagen formada a la pantalla de un ordenador. Los microscopios electrónicos sólo se pueden ver en blanco y negro, puesto que no utilizan la luz, pero se le pueden dar colores en el ordenador, su funcionamiento es semejante a un monitor monocromático.

Algunos materiales biológicos por ejemplo los insectos que tienen una cutícula dura se pueden secar al aire, pero como la mayoría contienen agua al ser secados al aire se distorsionan y dañan. Por esto la muestra se procesa

fijándola con glutaraldehido y posteriormente con otro fijador como el tetraoxido de osmio para finalmente deshidratarla, sustituyendo el agua por un solvente de tensión superficial más baja que se evapora fácilmente; generalmente se utiliza alcohol etílico o acetona, este ultimo posee una tensión superficial ligeramente menor, no se mezcla con el agua, de preferencia se coloca un crioprotector como el acetato de amilo para posteriormente lavar con CO<sub>2</sub> líquido y deshidratar a punto crítico, ( el punto crítico es aquel en el que el CO<sub>2</sub> líquido y gaseoso coexisten a una determinada temperatura y presión, de tal manera que el secado ocurre sin que una interfase líquido-gas pase por la superficie de la célula) quedando así perfectamente secas, libres de agua y sin deformación provocado por el proceso de secado. Una vez obtenidas son pegadas en el portamuestras del MEB y cubiertas con baño de metal (oro, paladio, aluminio etc.) que al hacerlas electro-conductivas evita que adquieran carga electrostática y con esta, desvíen los electrones (González, Ruiz, Hernández 2003).

(Fig. 1) Diagrama del Microscopio Electrónico de Barrido.



## 1.7 MICROSCOPIA CONFOCAL.

El Microscopio Confocal (MC) es esencialmente un microscopio de fluorescencia al cual mediante aditamentos y forma de obtención de imagen se ha transformado en un poderoso instrumento de investigación y estudio de muestras patológicas (Fig. 2).

La forma de iluminación, está constituida por láseres de diferente composición, lo que les hace emitir luz de longitud de onda definida para que exciten al o los fluoróforos utilizados en la tinción de la muestra. La longitud de onda de cada laser es adecuada para algún fluoróforo. Los rayos láser emiten luz coherente, monocromática y de alta intensidad, en algunos láseres especiales puede ser variada según los parámetros de operación. Se pueden usar tres láseres diferentes de manera simultánea y detectar simultáneamente los diferentes fluoróforos depositados en la muestra. Estos haces son concentrados por un condensador en un punto (Pinhole o apertura) de unas cuantas micras de diámetro. Después, por medio de un sistema de espejos se imprime a los haces un movimiento de barrido o escansión sobre la muestra. La luz de las diferentes emisiones de los fluoróforos es separada por medio de espejos dicróicos, filtrada para eliminar la luz del laser y procesada electrónicamente para proyectar al mismo tiempo los diferentes colores en una pantalla (Fig. 3). El MC tiene además un sistema de aperturas (pinhole o colimador de orificio delimitante) que le permite, según la altura a que se colocan en el haz luminoso separar los diferentes planos de la muestra. Permite este sistema hacer cortes ópticos de la muestra e incluso una reconstrucción tridimensional de la misma.

En la (Fig. 4) se ilustran los parámetros de absorción y emisión del DAPI, que requiere luz ultravioleta para excitarlo a su punto de máxima excitación en 356 nm y emite a 458 nm. Existen en el mercado láseres con espectros de emisión que cubren el espectro visible, el infrarrojo y el ultravioleta.

Esta técnica ha ido adquiriendo cada vez mayor popularidad entre las comunidades científica e industrial. Se aplica típicamente en las ciencias de la vida y en la inspección de semiconductores.

El concepto de imagen confocal fue patentado por Marvin Minsky en 1957. En un microscopio de fluorescencia convencional (p.ej., de campo amplio), el espécimen entero está sobresaturado de luz a par tir de l a fuente de iluminación. Debido a la conservación de la intensidad de la luz en su recorrido, todas las partes del espécimen a lo largo de su ruta óptica serán excitadas y la fluorescencia detectada por un fotodetector o una cámara. Por el contrario, un MC utiliza iluminación puntual y un "pinhole" en un plano óptico conjugado en frente del detector. La gran concentración luminosa sobre el espécimen hace necesario el uso de líquidos de montaje de l as muestras que sea antiblanqueante.

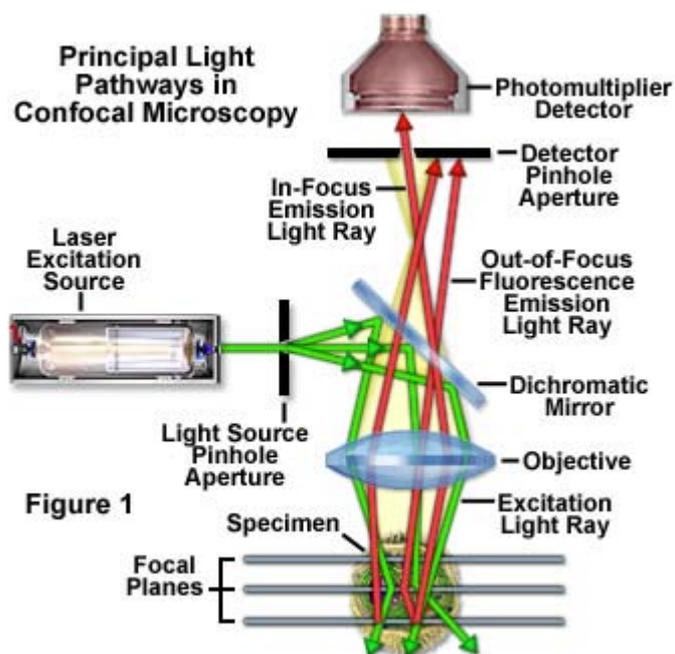
Este avance en el campo de la microscopía nos posibilita el estudio tridimensional de las muestras, incluyendo su interior, y en determinados materiales permite la obtención de imágenes de su superficie mediante reflexión.

La microscopía confocal también se aplica para el estudio de muestras *in vivo* a lo largo de u na secuencia temporal o p ara la colocalización de di stintos marcadores en una región concreta. La m icroscopía confocal mejora las imágenes convencionales de fluorescencia al captar la fluorescencia generada desde el plano focal en la muestra, rechazando cualquier otra luz que provenga desde abajo o arriba del plano focal. La eficiente óptica confocal de barrido de punto y detección de diafragma de los sistemas FluoView elimina virtualmente la luz "fuera de foco" y produce imágenes de alto contraste con una resolución extraordinaria. El sistema FluoView es una estación de trabajo totalmente integrada que incorporan programas de toma y análisis de imágenes fáciles de usar con óptica confocal de alta resolución que no requiere de alineación por parte del usuario con una interfaz gráfica basada en Windows y fácil de usar permite que los usuarios generen imágenes rápidamente en v arias modalidades de barrido como XY, XZ, XT, XYZ, XYT y XYZT. Los formatos estándar de imágenes son el TIFF y el AVI, que permiten la exportación fácil y directa de imágenes FluoView a paquetes de análisis sin conexión.

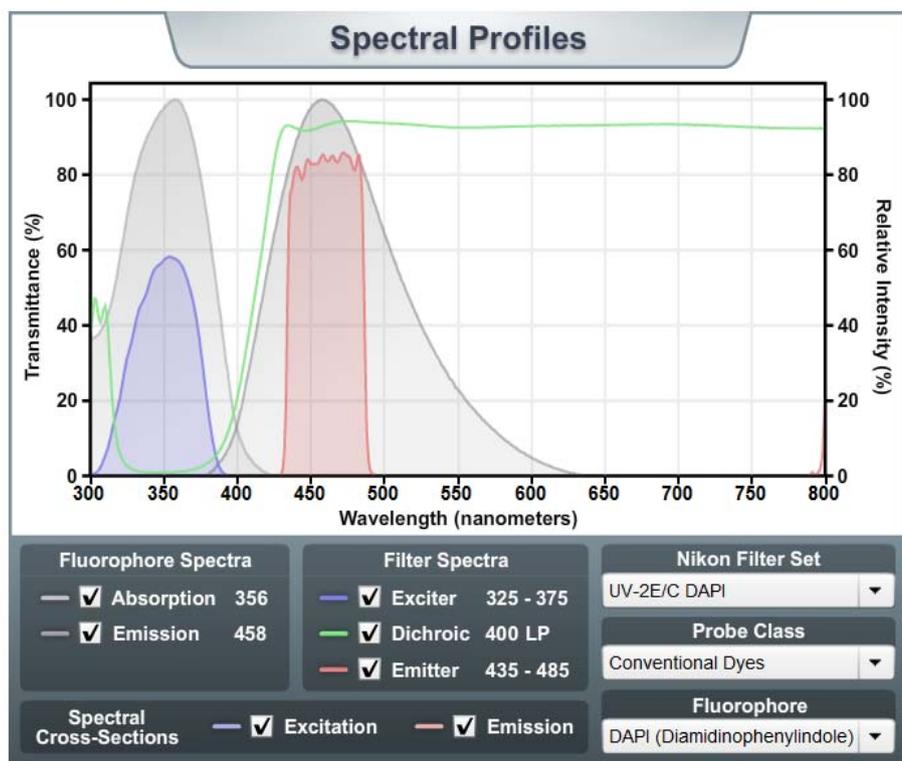
(Fig. 2) *Microscopio Confocal*



(Fig. 3) *Diagrama del Microscopio Confocal*



(Fig. 4) Perfiles de espectro del Microscopio Confocal



## CAPITULO 2. OBJETIVOS

### 2.1 HIPOTESIS.

En base a la administración de dietas contaminadas con Aflatoxinas B1 (Metabolito secundario del hongo *A. flavus*) a conejos, se podrá evidenciar y analizar el daño y lesiones que dicha aflatoxina pudiera ocasionar al animal, mediante el uso de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) apoyando el resultado con Microscopia Optica (MO) y Microscopia Confocal (MC).

### 2.2 JUSTIFICACION.

En muchos países al igual que en México, la reproducción de conejo representa una gran actividad económica en muchas regiones y estados del país y ya que se han encontrado pocos estudios del efecto de las aflatoxinas sobre los conejos y debido a que los animales que han sido alimentados con

pelets contaminados pierden peso aun que el intestino es un órgano que en la histopatología siempre se ha encontrado sin cambio patológico aparente, se decidió incluir el estudio del daño intestinal en conejos (Lagomorfos) por el consumo de alimento contaminado con AFB<sub>1</sub> evidenciándolo por medio de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB).

Se señala entonces la importancia de realizar estudios acerca del daño que generan las micotoxinas en el organismo de animales de corral y humanos, ya que a medida que se avance en cuanto al reporte y evidencia de las afecciones que causan dichos metabolitos, podremos conocer comportamientos y características que faciliten su diagnóstico y esto nos lleve a su posible erradicación. También resaltamos la importancia en encontrar respuestas inmediatas para reconocer y contrastar enfermedades relacionadas a aflatoxicosis, que generan pobre eficiencia de producción, menores aumentos de peso, disminución de la respuesta inmune y en casos agudos hasta la muerte.

Algunas de las micotoxinas son cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas. Causan daños al sistema nervioso, al TGI, al tracto genitourinario, piel, son hepatotóxicas, nefrotóxicas, disminuyen la resistencia tisular, con lo que pueden afectar la salud de muchos animales y del mismo hombre que consume a estos animales en su dieta, además de generar pérdidas económicas severas a productores de todo el mundo.

### **2.3 OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.**

#### *Objetivo general.*

Evaluar el daño que causan las AF en el intestino del conejo (lagomorfos), mediante la obtención y observación de muestras, provenientes de conejos alimentados de pelets contaminados con AFB<sub>1</sub>, empleando Microscopia Óptica (MO), Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Microscopia Confocal (MC) para evidenciar lesiones causadas en el sistema digestivo del conejo por la presencia de las mismas.

*Objetivos particulares.*

- Estudiar el daño intestinal *in vivo* en conejos mediante la alimentación de estos, con *pelets* previamente contaminados con aflatoxinas.
- Realizar estudios histopatológicos en intestino e hígado de conejo para evidenciar el daño ocasionado por aflatoxinas.
- Observar cortes de intestino por MEB y corroborar el daño en epitelio intestinal por aflatoxinas B1.
- Detectar la autofluorescencia de los aductos de AFB1 en epitelio intestinal e hígado por medio de la MC.

## **CAPITULO 3. DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

### **3.1 MATERIALES Y METODOS.**

#### **3.1.1 ANIMALES EXPERIMENTALES.**

Se adquirieron 10 conejos jóvenes de la variedad Nueva Zelanda, sexo indistinto, de dos meses del destete, de la granja de producción cunícula de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C). Se alojaron en jaulas de acero inoxidable en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la UIM (Unidad de Investigación Multidisciplinaria) de FES-C campo 4. Los diez conejos fueron alimentados con una dieta comercial normal y agua *ad libitum*, durante 1 semana para su adaptación al nuevo local. Después fueron divididos en 2 grupos, asignados al azar a 2 tratamientos uno con alimento comercial (Alimento para conejos de Purina) y el otro con alimento contaminado con aflatoxinas. Ya iniciada la experimentación se les proporcionaron 150g a cada conejo según el tratamiento al que pertenecían. Se mantuvieron en experimentación durante veintiún días, se pesaron individualmente cada tercer día. Al fin del experimento, se les practicó la eutanasia y se hizo la necropsia a cada animal, colectando muestras de hígado, bazo y tres fracciones de intestino: duodeno, yeyuno e ileon.

Para estudios histopatológicos, se fijaron por inmersión en formaldehído al 10% y para MEB, muestras paralelas de intestino, se fijaron en Karnovsky extendiendo cada fragmento sobre una placa de plástico al cual se engraparon los tejidos.

### **3.1.2 ALIMENTO.**

Las dietas se prepararon con arroz contaminado con 615ppb de *Aspergillus flavus*, dicho arroz fue molido, para ser espolvoreado sobre alimento comercial que previamente fue humedecido con el fin de que se adhirieran al alimento y así quedar contaminado.

El hongo *A. flavus* fue re-aislado en los medios Zchapeck y PDA a partir de una ampolleta liofilizada proporcionada por el *Dr. Juan Carlos del Rio*. Cuando el crecimiento y esporulación del hongo fueron abundantes, se hizo un raspado superficial, parecido a un rasurado con el fin de extraer la mayor cantidad del hongo. Este raspado fue incorporado a un volumen de 100 ml., se filtró a través de papel filtro para eliminar los grumos y dejar a las esporas monodispersas en la solución. Se tomó un volumen de 1 ml. del filtrado y se colocó en la cámara de New Bauer para contar las esporas. Este conteo se repitió seis veces en los diferentes cultivos. Una vez establecido el número de Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml.) de la suspensión obtenida; esta es agregada a 2.5kg. de arroz (arroz comercial marca Morelos) en un recipiente de 18 litros y se ajustó la humedad al 18%. Se incubó a 24°C durante dos semanas con aireación por medio de rotación diaria. Se esterilizó en autoclave y se secó a 50°C durante 24 hrs. en estufa de aire forzado. Posteriormente se dejó a temperatura ambiente por 24 hrs., para equilibrar la temperatura.

La producción de AF en el arroz y la concentración real en la dieta contaminada se evaluaron por el método de la columna de Aflatest®. El método se realizó de la siguiente forma: a 50g de la muestra molida se le adicionaron 5g de NaCl, posteriormente se le agregaron 100ml de metanol al 80%, se agitó esta mezcla durante 1min., se filtró y del filtrado se tomó una alícuota de 10ml y se diluyó con 40 ml de agua para tener un total de 50ml, se mezcló y filtró con papel

Whatman; se tomó una alícuota de 10ml y se pasó gota a gota a través de una columna de inmunoafinidad, después se lavó la columna con 20ml de agua, una vez realizado esto se hizo pasar 1ml de metanol HPLC lentamente por la columna, al líquido resultante se le agregó 1ml del revelador. Agitar durante 15seg. Leer en el fluorómetro. El fluorómetro es calibrado con los estándares del aflatest®. Para esta determinación se ocupó un Fluorómetro VICAM serie 4, modelo VICAM V1.0.

### 3.1.3 ESTUDIOS PATOLOGICOS.

Todas las muestras (excepto las destinadas al MEB) se incluyeron en parafina para preparar laminillas teñidas con hematoxilina y eosina. Cortes desparafinados y sin teñir, se montaron con Entellan® para su posterior observación en el MC.

Para los estudios de MEB, las muestras se sumergieron rápidamente en fijador de Karnovsky, se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente y se sometieron al proceso de secado a punto crítico en una Samdri-780A, Tousimis Research Corporation Critical Point Dryer, después se cubrieron de una fina capa de oro en un Fine Coat Ion Sputter-JFC-1100, para su posterior estudio en un Microscopio JEOL-6360LV de bajo vacío.

### 3.1.4 METODO ESTADISTICO.

Esta experimentación utilizará como método estadístico la prueba de hipótesis, cuyas fórmulas aplicables son:

$$t = \frac{(X_1 - X_2)}{S \sqrt{\frac{1}{n_1} - \frac{1}{n_2}}} \quad S^2 = \left[ \frac{(n_1 - 1)S_1^2 - (n_2 - 1)S_2^2}{n_1 - n_2 - 2} \right]$$

## **CAPITULO 4. RESULTADOS.**

Se recibieron los conejos de dos meses del destete de sexo indistinto. Todos ellos fueron adquiridos en la Unidad de Reproducción Cunícola de la FES-C campo 4, en donde se mantienen a los animales en condiciones sanas y apegadas a la NOM-062-ZOO-1999. Dichos conejos fueron alojados en la Unidad de Aislamiento, perteneciente a la Unidad Multidisciplinaria Experimental en la FES-C campo 4, en jaulas de acero (Fig. 5 y 6), las condiciones de temperatura controlada a 25°C, humedad relativa del 60% y control de luz automática con apagado total a las 7:00 pm, todo lo anterior se realizó bajo el cumplimiento de la NOM-062-ZOO-1999 en donde se especifica el correcto manejo de animales de laboratorio. Fueron alimentados con dieta comercial normal (pelets comerciales marca Purina) y agua (obtenida de un equipo purificador basado en el uso ozono para su purificación) *ad libitum* durante una semana para asegurar su acondicionamiento y adaptación. Al final de la semana de adaptación, los individuos fueron divididos en 2 grupos de peso homogéneo y asignados al azar a los dos tratamientos mencionados. Los conejos se mantuvieron en experimentación durante 21 días, pesándolos individualmente cada tercer día y sacrificándolos al final de los 21 días.



(Fig. 5) Jaulas para Conejos



(Fig. 6) Conejos Nueva Zelanda

El conteo de esporas efectuado al inóculo del arroz arrojó un resultado promedio de 110 UFC/ml, de tal manera que los 2.5Kg de arroz fueron inoculados con 100 ml del cosechado de esporas.

Al final de tres semanas de cultivo con agitación diaria, y una vez esterilizado y secado el arroz, éste contenía 615 ppb.

1.000Kg → 615ppb  
0.488Kg ← 300ppb

$0.488\text{Kg} \div 7 \text{ días} = 69.7 \text{ g/día}$  de arroz contaminado

El consumo de alimento idóneo para un conejo es de 150grs. Por lo tanto:

80.3 grs de alimento sin contaminar (alimento comercial)

+

69.7 grs de arroz contaminado (Aflatoxina)

---

150grs. de alimento

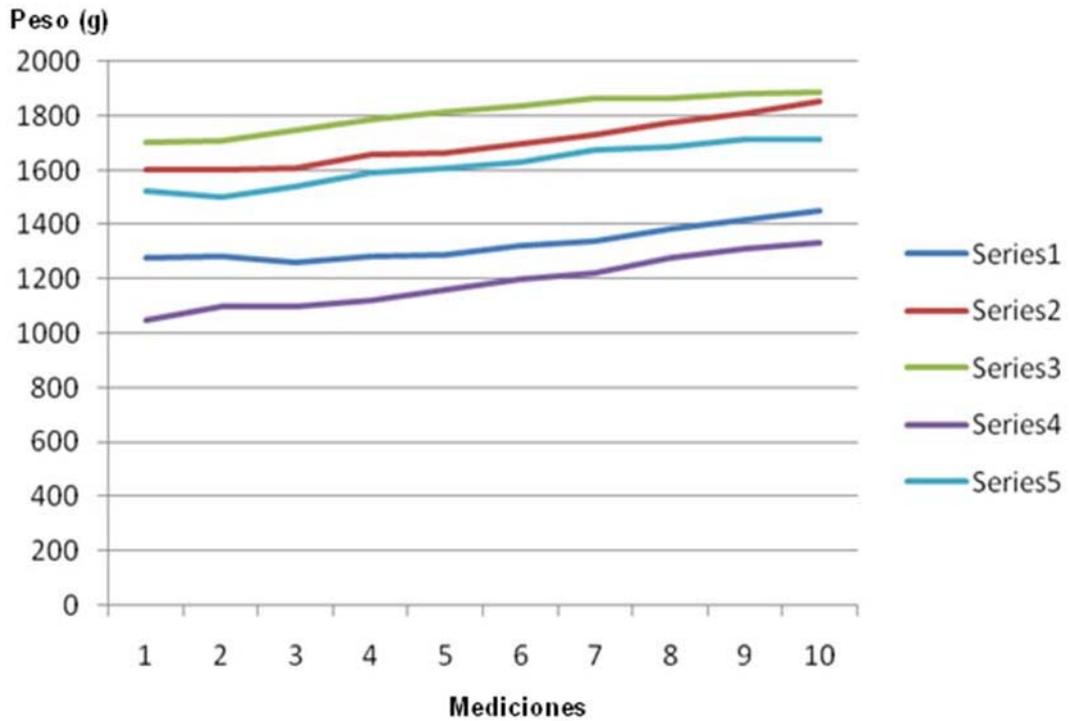
Los conejos fueron pesados cada tercer día, registrando la ganancia de peso y haciendo una relación con el consumo de alimento (Cuadro 1), con lo anterior se obtuvo la eficiencia alimentaria.

*(Cuadro 1) Ganancia de peso y consumo de Alimento de Tratamiento 1 y 2.*

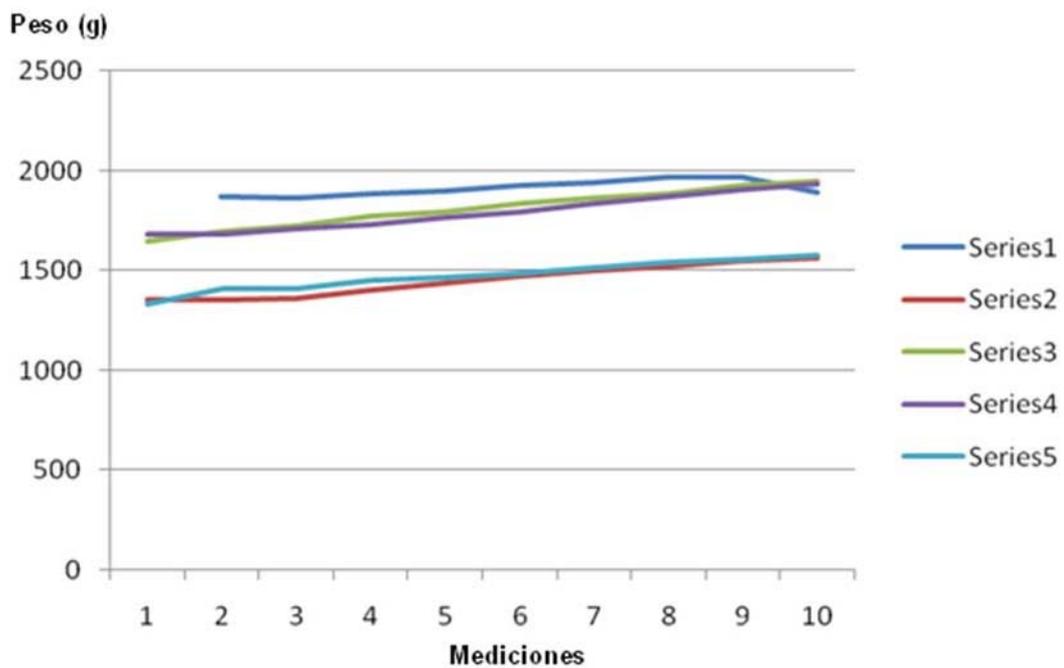
Experimento	Ganancia de peso g	Consumo de alimento g	Eficiencia alimenticia	Aflatoxinas consumidas en el periodo ( µg/kg)
1 Sin contaminar	173	3273	0.0529	<20.00
2 Sin contaminar	252	2485	0.1014	<20.00
3 Sin contaminar	185	2310	0.0801	<20.00
4 Sin contaminar	285	3418	0.0834	<20.00
5 Sin contaminar	190	3003	0.0633	<20.00
<b>MEDIA</b>	<b>217</b>	<b>2897.8</b>	<b>0.0762</b>	<b>&lt;20.00</b>
<b>CV</b>	<b>0.23</b>	<b>0.17</b>	<b>0.25</b>	<b>0.00</b>
<b>S</b>	<b>48.83</b>	<b>484.35</b>	<b>0.02</b>	<b>0.00</b>
1 Contaminado	251	3030	0.0828	2319.14
2 Contaminado	210	2600	0.0808	1586.78
3 Contaminado	300	3051	0.0983	1862.03
4 Contaminado	250	3050	0.0820	1861.42
5 Contaminado	245	2951	0.0830	1801.00
<b>MEDIA</b>	<b>251.2</b>	<b>2936.4</b>	<b>0.0854</b>	<b>1886.07</b>
<b>CV</b>	<b>0.13</b>	<b>0.07</b>	<b>0.09</b>	<b>0.14</b>
<b>S</b>	<b>32.09</b>	<b>192.47</b>	<b>0.01</b>	<b>267.18</b>

La ganancia de peso se graficó contra tiempo transcurrido (Gráfica 1 y 2), con la finalidad de poder observar el efecto de AFB1 en la ganancia de peso.

(Gráfica 1) Ganancia de peso de los no contaminados.



(Gráfica 2) Ganancia de peso de los contaminados.



En el Cuadro 2 se muestra un compilado del daño observado al usar el MO, mientras que en el cuadro 3 se muestra el compilado del daño observado al usar MEB; en ambos cuadros se asigna un valor referente al grado de daño, donde + es leve y ++++ es grave. Considerándose leve a lesiones superficiales en el menor número de vellosidades por campo observado; en el caso de las lesiones graves se consideran daños significativos sobre el epitelio que atenten directamente la integridad del tejido y por lo tanto la salud del animal. Se asigna – cuando no se presenta en la muestra estudiada el daño especificado.

*(Cuadro 2) Evidencia del daño en muestras de intestino por MO*

DAÑO	CONTAMINADOS	NO CONTAMINADOS
Discontinuidad en vellosidades.	++	+
Vellosidades rotas.	++	+
Epitelio desprendido.	+++	-
Congestión vascular en epitelio.	++	-
Reacción celular.	++++	-

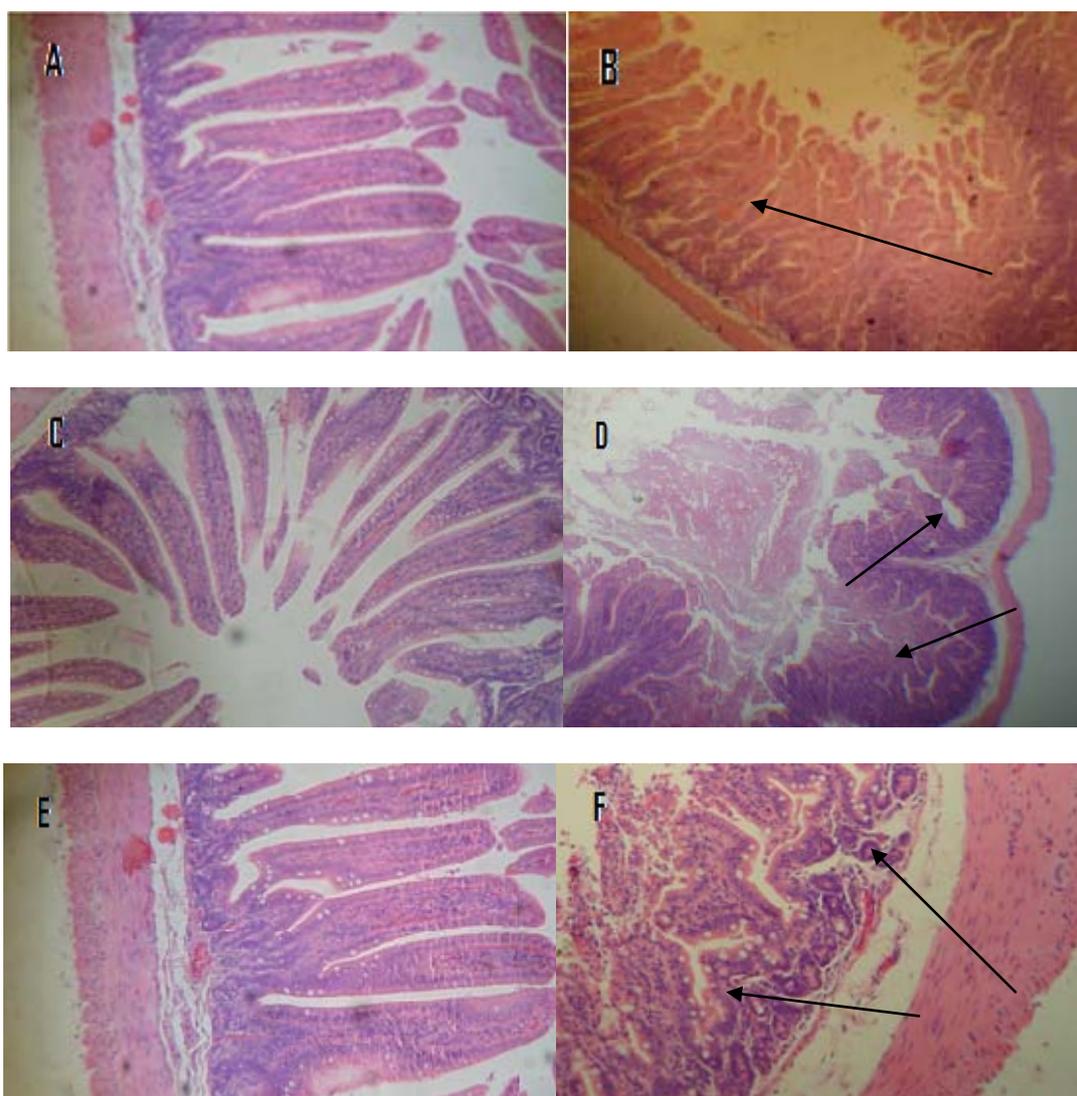
*Se da un valor referente al grado de daño, donde + es leve y ++++ es grave.*

*(Cuadro 3) Evidencia del daño en muestras de intestino por MEB.*

DAÑO	AFECTADOS	NO AFECTADOS
Vellosidades irregulares	-	+
Células calciformes	-	+
Presencia de microorganismos	++	+
Células desprendiéndose	++	+
Huecos	+++	+
Fusión de microvellosidades	+++	+
Zonas calvas	+	-
Células en apoptosis	+++	-
Vellosidad contraída o colapsada	++++	-
Cicatrización	++++	-
Poco daño	-	+
Presencia de linfocitos	++	-

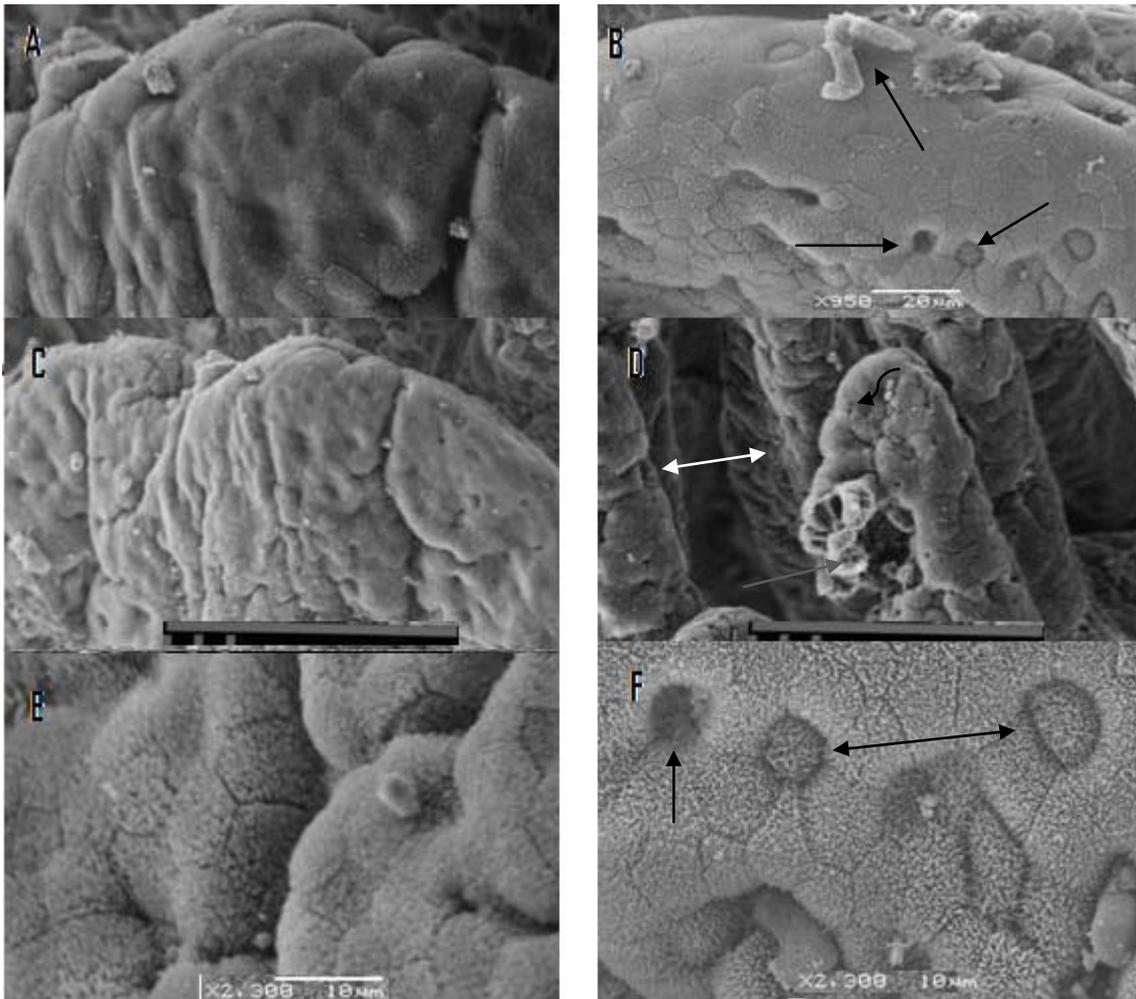
*Se da un valor referente al grado de daño, donde + es leve y ++++ es grave.*

(Fig. 7) Intestino de conejos en MO.



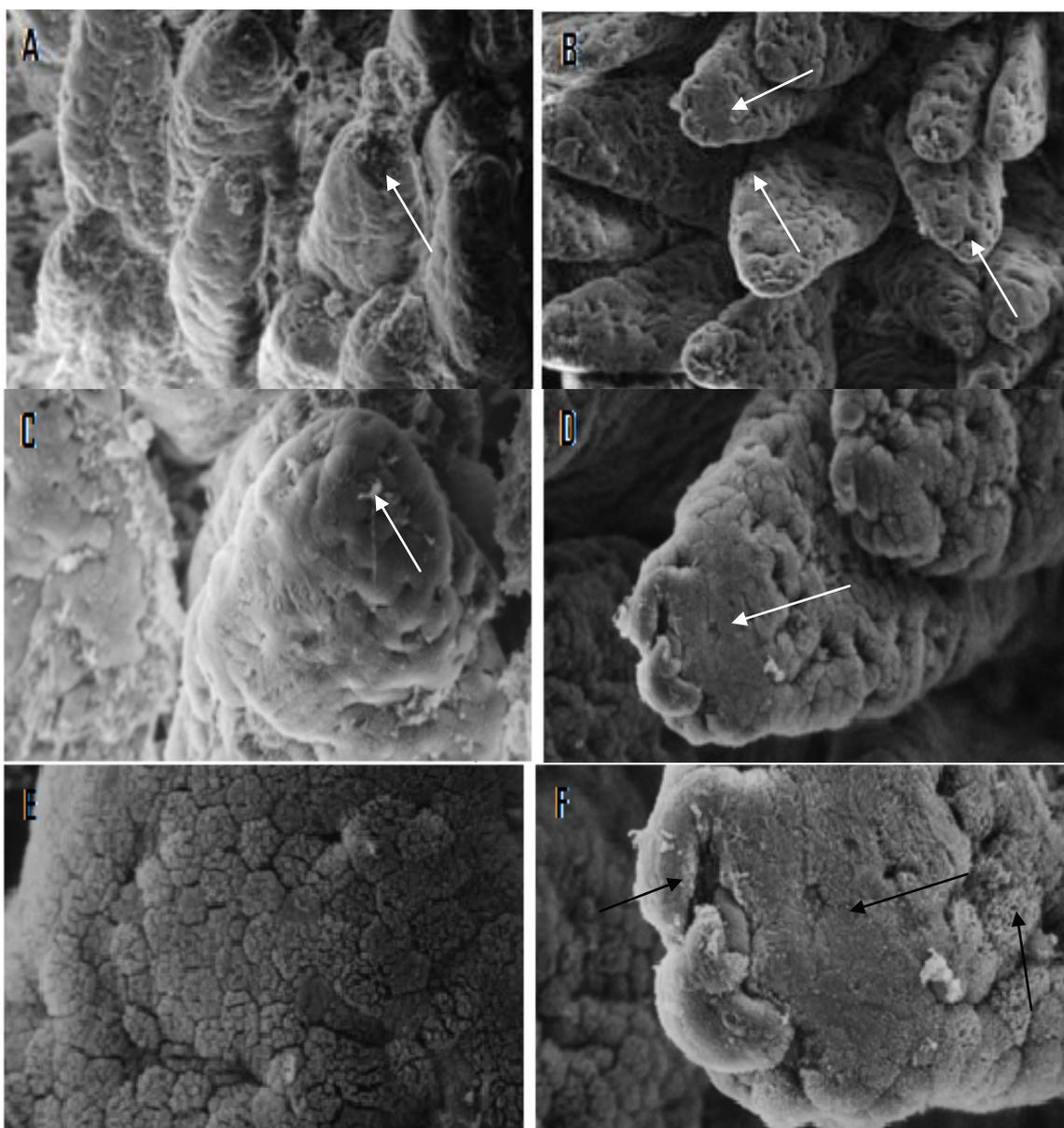
**FOTOS DE MO DUODENO, YEYUNO E ILEON DE CONEJO.** En la foto "A" se expone un Duodeno sano (40x) con vellosidades completas y bien definidas los pequeños trozos se deben a la manipulación de la muestra y no a un daño provocado por la intoxicación.; En la foto "B" (10x) se indica con flechas algunas zonas de daño como la clara fusión de vellosidades. En la foto "C" (40x) se muestra un Yeyuno sin lesión y con una correcta forma y distribución de la vellosidades. La foto "D" (40x) el Yeyuno se muestra con evidentes lesiones en cuanto a fusión de vellosidades y la posible apoptosis de las células y contenido celular que se desprende del epitelio. La foto "E" (40x) Ileon, presenta células sin cambios morfológicos y manteniendo congruencia con el grupo control; La foto "F" (40x) las flechas muestran fusión de vellosidades y un cambio severo en la morfología de las células del epitelio intestinal en comparación con el control.

(Fig. 8) Duodeno de conejo en MEB.



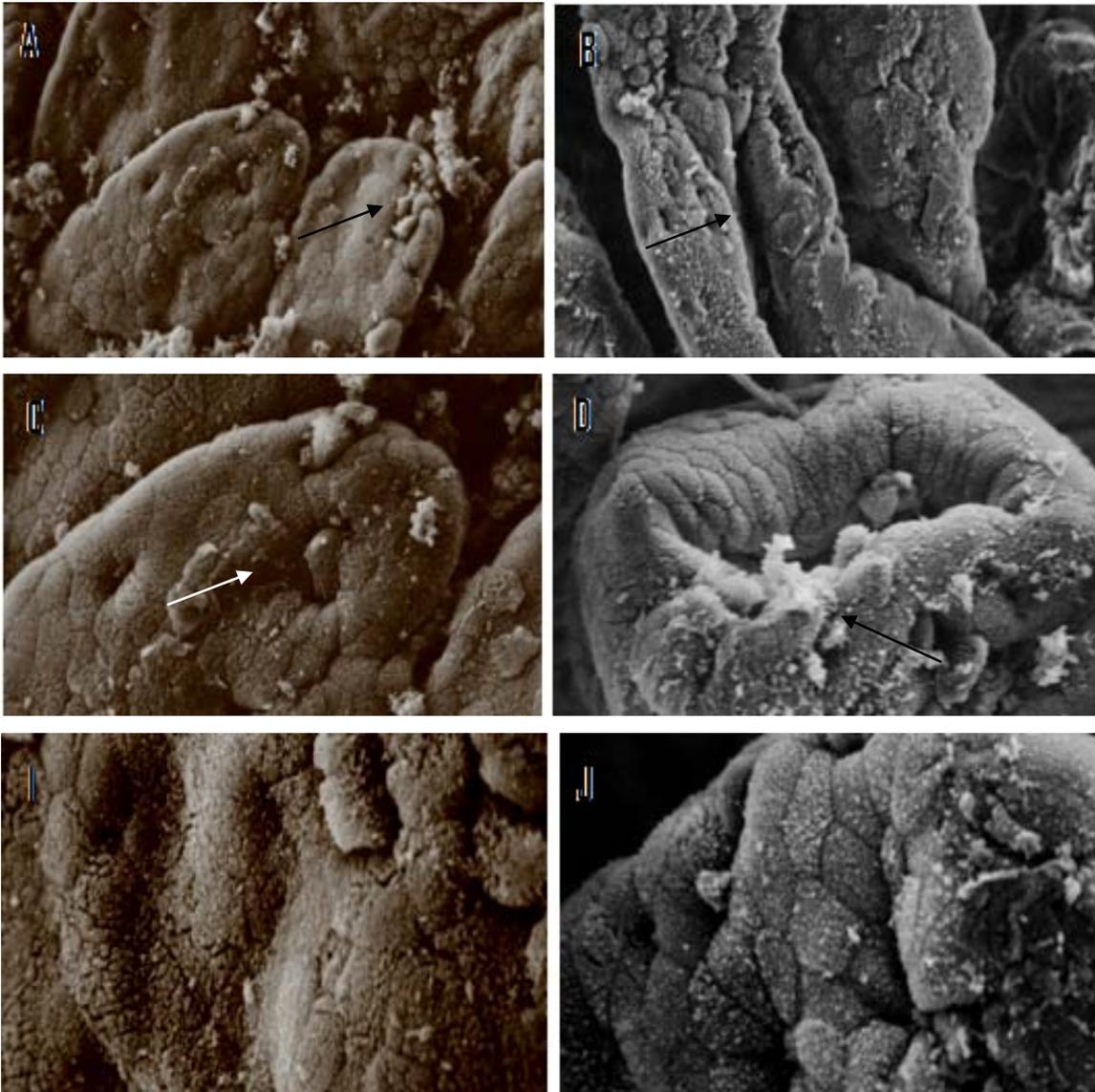
**FOTOS DE MEB DUODENO DE CONEJO.** En la foto "A" se expone un duodeno sano(950x) con microvellocidades completas a lo largo y ancho de la misma; En la foto "B" (950x) se indica con flechas algunas zonas de daño como: el hundimiento de microvellosidades, huecos y células en Apoptosis. En la foto "C" (450x) se muestra duodeno sin lesión con presencia de restos de contenido intestinal. La foto "D" (450x) muestra separación irregular entre la vellosidades, un severo hueco en la punta y el inicio de su colapso. La foto "E" (2300x) muestra la región y las células que forman las microvellosidades duodenales de forma completa y sana a diferencia de la foto "F" (2300x) en donde mostramos células que ya sufrieron apoptosis y microvellosidades con apariencia granular resultado de la fusión de una o mas microvellosidades, así como huecos producidos por las aflatoxinas.

(Fig. 9) Yeyuno de conejo en MEB.



**FOTOS DE MEB YEYUNO DE CONEJO.** En la foto "A" (150x) se expone un yeyuno que presenta vellosidades irregulares, con alto contenido de biogel, señalando zonas de daño; En la foto "B" (150x) se indica con flechas algunas zonas de daño como: huecos resultado de desprendimiento celular. En la foto "C" (450x) se muestra duodeno sin lesión pudiendo observar células caliciformes con contenido de moco. La foto "D" (450x) muestra una zona rapada (sin microvellosidades). La foto "E" (1000x) muestra la región y las células que forman las microvellosidades de forma completa y sana a diferencia de la foto "F" (1000x) una zona sin microvellosidades, lisa, con fusión de microvellosidades y con huecos producidos por el desprendimiento celular.

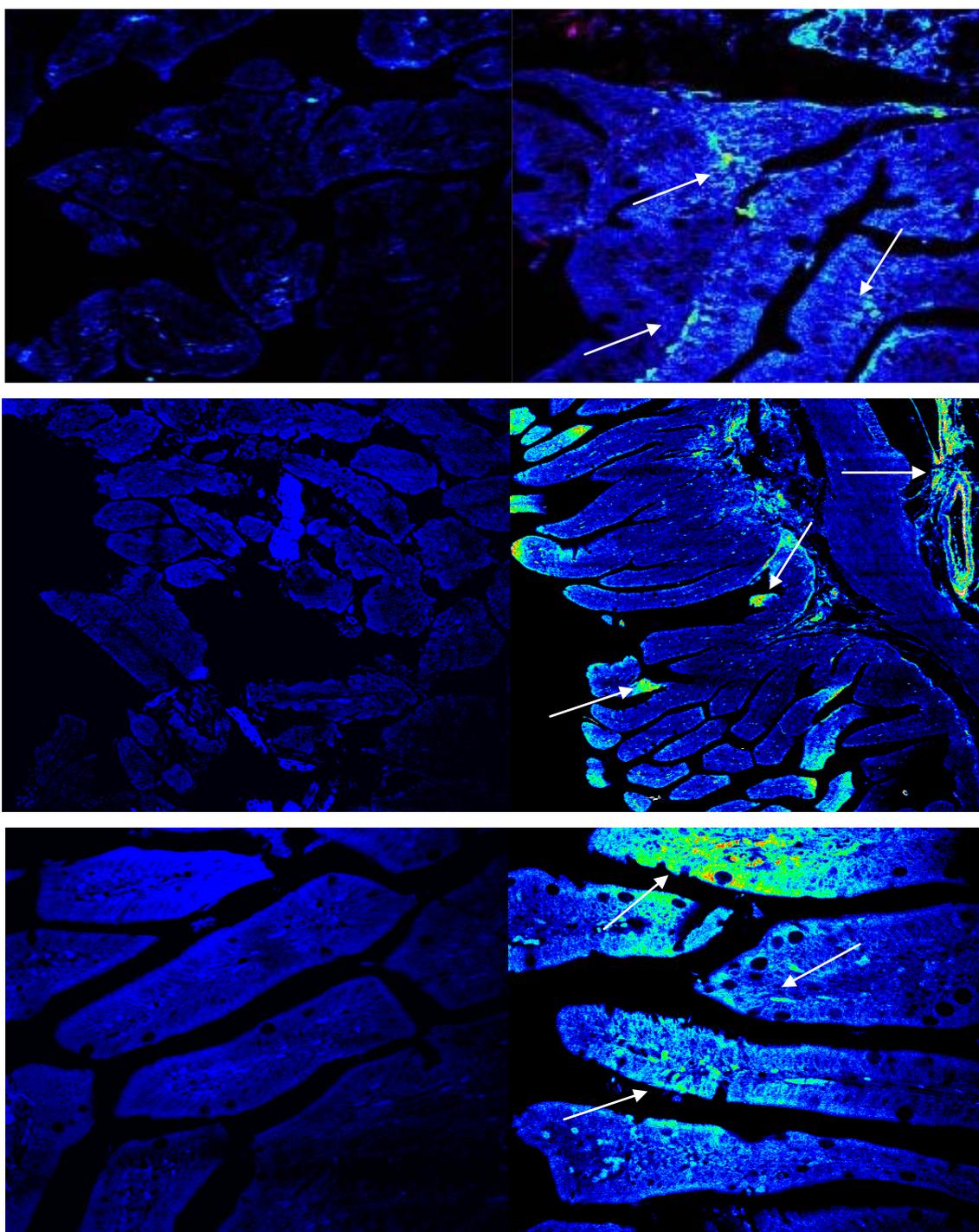
(Fig. 10) Íleon de conejo en MEB.



**FOTOS DE MEB ILEON DE CONEJO.** En la foto "A" (450x) se expone un ileon que presenta daño visible y desprendimiento celular; En la foto "B" (450x) se muestra una vellosidad contraída o colapsada. En la foto "C" (1000x) se muestra desprendimiento celular. La foto "D" (1000x) se observa la vellosidad colapsada, además de la presencia de linfocitos. La foto "I" (2000x) íleon sano a diferencia de la foto "J" (2000x) en donde se observan fusión de microvellosidades y la presencia de microorganismos.

Se puede observar en las Fig 7, 8, 9 y 10 que la concentración fue suficiente para causar lesión y con ello observar cambios patológicos en el intestino de conejos, esto tomando en cuenta de forma comparativa contra el grupo de conejos no contaminados y sin lesión.

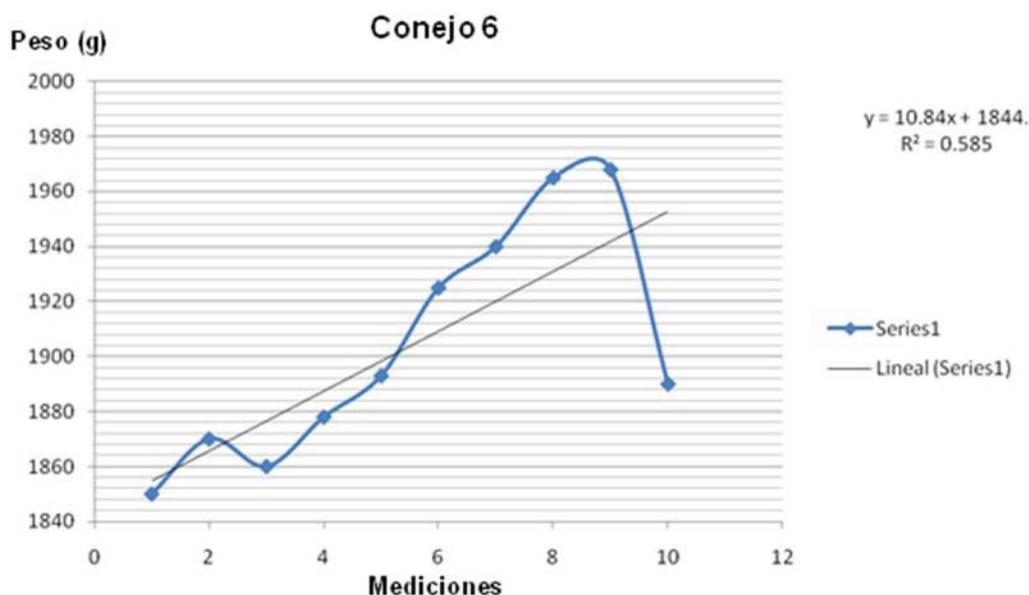
(Fig. 11) Intestino de conejos en MC.



**FOTOS DE CONFOCAL INTESTINO DE CONEJO.** A la izquierda se logra ver duodeno, yeyuno e íleon respectivamente, de conejos sanos. A la derecha podemos observar duodeno, yeyuno e íleon respectivamente, de conejos contaminados con aflatoxina. Obtenidas a 360 nm. Las flechas señalan zonas de autofluorescencia en el tejido de conejos con AF y que están ausentes en los tejidos sanos. Creemos que las zonas de fluorescencia representan el acúmulo de aductos en núcleos celulares.

Durante la fase experimental se observa la posible presencia de un fenómeno llamado hormesis, el cual se trata de explicar en la gráfica 3.

(Gráfica 3) Ganancia de peso con mínimos cuadrados de un conejo contaminado. Ejemplo de hormesis.



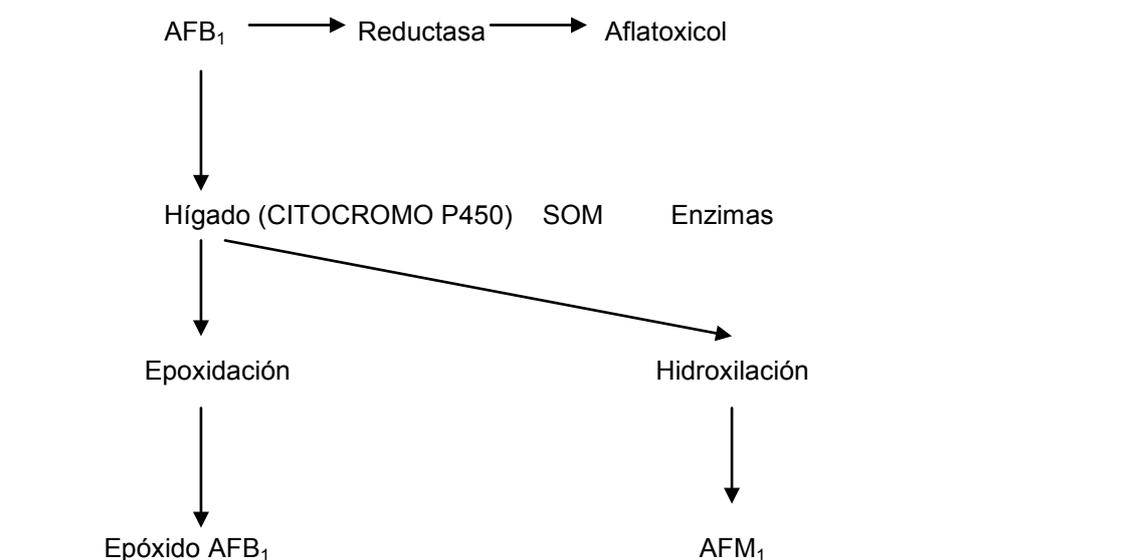
## CAPITULO 5. DISCUSION

De un total de cuatro pruebas previamente citadas en esta tesis: Microscopia Confocal, Optica, Electrónica y pruebas físicas; que refieren a ser parte del estudio de manera esencial en este trabajo, pero sobretodo de la evidencia que aportan, se encontró satisfactoriamente que todas ellas arrojaron resultados significativos.

El hongo crece en una gran variedad de ingredientes para piensos de animales y alimentos, el hongo requiere condiciones apropiadas de humedad y temperatura para crecer y producir sus toxinas. Las condiciones de almacenaje de los alimentos preparados pueden propiciar el crecimiento del hongo, aun cuando este ya no se encuentre vivo en el alimento. Las AF son resistentes a la

inactivación térmica y a muchos tratamientos que se emplean para removerlas de los alimentos sin afectar el valor nutritivo de estos.

Los efectos tóxicos de las micotoxinas comúnmente observados en conejos incluyen cuadros agudos y crónicos, en casos graves provocan la muerte de los conejos, en especial jóvenes. También se pueden dar casos de aborto en reproductoras y muerte por efecto de una micotoxicosis (Gimeno y Martins 2002) Las AF son absorbidas en el tracto gastrointestinal por su alta liposolubilidad, son biotransformadas en el hígado por enzimas microsomales de la superfamilia del citocromo P450 (IARC). Que interviene en la formación de la forma exo-epóxido y endo-epóxido y la formación de de una subsecuente AFM<sub>1</sub>.



(Fig. 12) SOM Tomado de (Tejada 2007).

### A) Inoculación del arroz y producción de aflatoxinas.

El inóculo fue aparentemente bajo (110 UFC/ml) ya que otros trabajos de investigación refieren a la utilización de mayor cantidad de inóculo para poder garantizar una mayor contaminación por aflatoxinas. Uno de los mejores sustratos para la proliferación de estas tóxicos es el arroz, razón por la cual se tomo como base para el desarrollo de esta labor (Tejada 2007).

Sin embargo no se pudo generar un ajuste óptimo en la concentración de aflatoxinas en la ingesta diaria de los animales, pues al aumentar su concentración, invariablemente esto significaría aumentar la cantidad de arroz,

lo que propiciaría la ingesta de una dieta no equicalórica que sin lugar a dudas repercutiría en el peso de los conejos, con lo que este aumento, sería una variable que dejaría de ser significativa para obtener resultados confiables, ya que arrojaría un resultado que no sería producto del desarrollo natural del trabajo.

**B) Contaminación del alimento.**

Se considera que los conejos, patos recién nacidos, gatos, truchas y cerdos, son altamente susceptibles; moderadamente, pavos, terneras, perros, borregos y monos; relativamente resistentes, pollos, hamsters, ratones y ratas, en todas las especies animales entre más joven es el animal la susceptibilidad se incrementa (*Patterson 1973*).

La concentración de la aflatoxina en el alimento ajustada fue de 300 ppb. ya que es la DL<sub>50</sub> a la cual los conejos presentan lesiones ocasionadas por la ingesta de estas micotoxinas (*Cuadro 4*). La bibliografía consultada indica que a esta concentración el conejo debería presentar cambios patológicos y lesiones base primordial del presente estudio. Además se decide causar una toxicidad crónica, para evitar el sufrimiento de los conejos sin justificación y siguiendo la NOM-062-ZOO-1999.

Tomando en cuenta el contenido de AF (ppb) en el alimento contaminado (*Cuadro 5*) esta concentración usada evitara causar un daño agudo que incurra en un trato fuera de lo establecido por la norma que habla de la utilización de animales para la experimentación.

*(Cuadro 4). Toxicidad de la aflatoxina B1 (Dosis Letal<sub>50</sub>) en diferentes especies animales.*

Especie Animal	DL50 ( mg/kg peso corporal)
Conejo	0.3-0.5
Patito	0.34-0.56
Gato	0.55
Cerdo	0.62
Trucha arcoíris	0.81 intraperitoneal

Perro	1.0
Cuyo	1.4-2.0
Borrego	2.0
Mono	2.2
Pollo	6.5-16.5
Ratón	9.0
Hamster	10.2
Rata	5.5-17.9

*(Patterson 1973)*

*(Cuadro 5) Contenido de aflatoxinas (ppb) en el alimento contaminado  
(promedio de 3 repeticiones)*

Tratamiento	AFB1 µg/kg
Promedio de lotes contaminados	310.33

*Método de análisis por Aflatest®. Para esta determinación se ocupó un  
Fluorómetro VICAM serie 4, modelo VICAM V1.0,*

Se observa en las Figuras 7, 8, 9 y 10 que la concentración fue suficiente para causar lesiones tales como: fusión de microvellosidades, apoptosis celular, aumento en el número de células caliciformes, colapso de vellosidades, entre otras, lo anterior se debe a diversas razones, entre ellas la necesidad de renovación celular acelerada debido al daño provocado, a la incapacidad de renovación ante el daño crónico y por otro lado el daño casi inmediato que provocan las AF; esto tomando en cuenta de forma comparativa contra el grupo de conejos no contaminados y sin lesión.

### **C) Ganancia diaria de peso**

En relación con el aumento o disminución de peso debido a trastornos gastrointestinales, se realizó una prueba de hipótesis comparando la ganancia de peso del grupo de conejos no tratados contra el grupo de conejos tratados, obteniendo como resultado que no hay diferencia significativa entre estos. Esta

información se corrobora con las graficas 1 y 2, aun que en dichas graficas se observa que la ganancia de peso es dependiente del consumo de alimento, la diferencia entre ambos tratamientos no es significativa estadísticamente.

La grafica 3 muestra la ganancia de peso de un conejo que refleja el *fenómeno de hormesis*. (Díaz et al), esto obedece a que la aflatoxicosis puede generar tal situación anómala, que es catalogada como un fenómeno toxicológico que se caracteriza por estimular la ganancia diaria de peso a dosis bajas e inhibirla a dosis altas (Gómez et al 2009). La hormesis se ha presentado en observaciones de los cambios de peso corporal en numerosos estudios (Díaz et al 2008).

Las AF pueden causar toxicidad aguda o crónica en los animales. Los efectos como daño de tipo agudo en hígado, cirrosis, inducción de tumores y efectos teratogénicos se han documentado en la literatura. Al administrar dosis pequeñas o acumulativas propiciamos una toxicidad crónica que nos llevó a observar en los conejos el *fenómeno de hormesis*, en relación al peso y al no observar cambios en la actitud de los conejos durante la experimentación, sin embargo tenemos evidencia de la toxicidad de la aflatoxina por la observación en diferentes lesiones microscópicas.

Lo anterior considerando que al aumentar la ingesta de arroz provocaría una dieta no equicalórica (mayor cantidad de calorías por la adición del arroz, sujeto a digestión primaria) lo cual tendría efectos sobre el crecimiento de los conejos, pero hablando nuevamente de la hormesis y de una dieta por supuesto con más contenido energético, que se verían reflejadas en la ganancia de peso.

La comparación entre la activación y detoxificación de la AFB<sub>1</sub>-epoxido en diferentes animales provee la base para entender por qué las especies varían en su sensibilidad a los efectos tóxicos y carcinogénicos inducidos por la AFB<sub>1</sub>, esto específicamente por la cantidad y tipo de enzimas que pueden ser propias de la especie. Los efectos también son influidos por variaciones de especie, sexo, edad, estado nutricional, efectos con otros químicos, dosis y el periodo de exposición (Mishra HN et al 2006, Ellis WO et al 1991)

La enfermedad por aflatoxicosis en conejos aparece raramente y es muy difícil definir el diagnóstico debido a los signos crónicos. Los animales pequeños son seguramente más afectados que los animales maduros (Johnston 2008) de acuerdo a lo anterior se justifica el haber elegido animales de dos meses de destete, relativamente jóvenes, puesto que se esperaba poder observar el daño sin que murieran pero tampoco fueran resistentes a la contaminación con la aflatoxina. La cantidad de alimento de 150g diarios se asignó por ser una cantidad establecida como apta para estos animales (*Surdeau y Henaff*).

#### **D) Cambios patológicos MO**

Las AF se acumulan en el cuerpo, aun en dosis permitidas pueden llegar a causar problemas clínicos si se administran piensos contaminados durante tiempos largos. El límite máximo permitido para AF totales en piensos y alimentos en México es de menos de 20 µg/kg.

Después de la ingestión de alimentos o piensos contaminados con toxinas, estas entran en contacto con los epitelios del tracto digestivo. Los epitelios pueden estar en contacto con concentraciones de micotoxinas mas altas, que las que se encuentran en la ingesta debido a la acción metabólica del organismo. El epitelio intestinal está constituido por una sola capa de células.

Siendo las AF liposolubles son fácilmente absorbidas del sitio de exposición, usualmente el TGI, al torrente sanguíneo después de la absorción la AFB1 es biotransformada por el complejo enzimático P-450 en diferentes metabolitos solubles en agua entre ellos la AFM1 y Aflatoxicol. Aun cuando la concentración de proteínas de la familia P-450 están en baja concentración en el intestino en comparación con el hígado, debido a sus pliegues, vellosidades y microvellosidades intestinales la superficie de exposición es enorme. Las enzimas que son capaces de transformar a la AFB1 en el intestino solo pueden proceder del epitelio intestinal. (*Galtier 2003*).

#### **E) Cambios patológicos MEB**

El destino de una micotoxina en el cuerpo animal depende de la cantidad y velocidad de absorción del tracto gastrointestinal (TGI), su distribución, su unión o localización en tejidos, los procesos de biotransformación y excreción.

La toxiquinética y la toxidinamia de una toxina, está determinada por las propiedades físicas del compuesto y por la interacción con los tejidos responsables de su eliminación (Galtier, 2003).

Con el MEB se observaron cortes de diferentes segmentos del intestino y se corroboró el daño en el epitelio intestinal debido a la dieta contaminada *Figuras 8, 9 y 10*, notando diferencias entre los dos tratamientos (fotos de la izquierda son control, las de la derecha son problema,) vellosidades irregulares, células desprendiéndose, huecos, fusión de microvellosidades, zonas calvas, vellosidades contraídas, entre otras (*Cuadro 4*)

En el *Cuadro 4* se muestra el grado de daño que resultó para ambos tratamientos, dejando distinguir que evidentemente el daño en los conejos contaminados es más grave. El daño es justificado por la observación de muestras con MEB como se muestra en las *Fig. 8, 9 y 10* en cuyos pie de figura respectivos se describe el daño que se puede observar.

El órgano mas importante en la detoxificación de las micotoxinas es el hígado, lo que crea el primer circuito (duodeno-hígado bilis) dentro del aparato digestivo debido a que las AF son segregadas en la bilis, con lo cual las AF dan una primera vuelta. En especial los lagomorfos como el conejo domestico digieren la fibra en el masivo ciego que tienen y al formar los cecotrofos, en los que las AF continúan activas, causan que se cierre el segundo circuito intestinal, ahora con el intestino delgado, ciego y por medio de los cecotrofos vuelve a la cavidad oral (*Hernández E. 2005*). La alta susceptibilidad de los conejos a las AF parece ser explicado por los circuitos digestivos, esto es la posibilidad de poder eliminar estas toxinas se reduce por su cecotrofia, (*Gimeno y Martins 2000*) observaron que solamente el 1.42% del total de las AF consumidas por conejos fueron excretadas en las heces.

Fundamentado esto en la formación del epóxido a nivel hepático pero también intestinal, y entonces recordamos que la AFB<sub>1</sub>-epóxido presenta dos conformaciones: una endo y una exo. La forma endo posee aproximadamente 500 veces más poder mutagénico que la forma exo (Steyn and Stander) el

fenómeno de mutagenicidad se explica mediante la formación de un compuesto estable por la unión covalente el N-7 de los restos de guanil del DNA o RNA. Esta formación de aductos persistentes se lleva a cabo en regiones de DNA ricas en guanina, es entonces que en el proceso de replicación, el complejo formado se intercala causando mutación. Después de la formación de AFB<sub>1</sub>-epóxido pueden formarse dihidrodioles metabolitos que se unen a proteínas celulares induciendo daño celular y eventualmente muerte celular; es importante resaltar que la AFB<sub>1</sub>-epóxido puede también formar aductos con la albumina y otras proteínas celulares. Cerca del 5% de la dosis ingerida de AFB<sub>1</sub> se une a albúmina (Steyn and Stander). Con la presente investigación se puede aseverar que la aflatoxina-epóxido no solamente causa mutagenicidad sino pueda causar un daño celular por su unión a proteínas celulares en intestino, lesiones fácilmente visibles en las fotos presentadas marcadas como problema.

La formación del epóxido requiere la presencia de un doble enlace entre los carbonos C8-C9 por esta razón las AF B<sub>2</sub> y G<sub>2</sub> son prácticamente atóxicas en comparación con las AF B<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>. La AFM<sub>1</sub> aunque presenta el doble enlace entre los carbonos C8 y C9 es dos órdenes de magnitud menos tóxica que la AFB<sub>1</sub> en cuanto a carcinogenicidad se refiere (*Díaz G.J.*). Todos estos daños fueron interpretados como una pérdida de la polaridad de las células epiteliales tal pérdida de la polaridad puede alterar la absorción de nutrientes, la interferencia en la absorción de nutrientes debidas a las alteraciones en las micro y vellosidades y los daños a las junturas celulares debido a las AF pueden explicar las ganancias de peso reducidas de los animales que consumen alimento contaminado por AF (*Hernández E. 2005*)

#### **F) Detección de aductos**

La uso del MC nos ayudo a demostrar una cierta fluorescencia provocada por la AFB<sub>1</sub>, que se distingue por su color fluorescente bajo la luz ultravioleta *B=Blue* situación que le dio el nombre como Aflatoxina B (*Abarca et al 2000*). Para el caso de las muestras de Intestino e Hígado de conejo por medio de su auto fluorescencia, revelaron su presencia sin embargo, pese a haber encontrado diferencias notables entre ambos tratamientos, no se puede aseverar que se

trate de la presencia de los aductos de manera confirmatoria ya que pueden estar presentes otros compuestos autofluorescentes, que no necesariamente son los aductos de las aflatoxinas. Para la detección de aductos se necesita el uso de un marcador celular (ADN o ARN) para asegurar que su fluorescencia corresponde realmente al aducto sin embargo como resultado se observa mayor intensidad de la fluorescencia de las muestras contaminadas (*Fig. 11*), lo que nos hace pensar en la presencia del aducto, además de saber que dichos aductos fluorescen en el rango 360 nm. El laser Argón Helio utilizado emite a 460nm, lo cual hace que la fluorescencia observada sea sólo la cola del pico de absorción de los aductos, y por lo tanto la duda.

Con este daño evidenciado se confirma la alta susceptibilidad del conejo a la intoxicación por aflatoxinas, como se menciona en la literatura, aunque resulta sorprendente la falta de síntomas en los animales vivos, en tanto que tramos del intestino mostraban el daño extremo aquí comunicado.

La determinación de AFB<sub>1</sub> libres puede ser detectada por HPLC por la figura aductos en orina que muestra una exposición de 24 a 48 hrs . De la misma forma un biomarcador para exposición crónica a aflatoxinas es la detección mediante aductos de AFB<sub>1</sub>-albúmina en sangre (Redy SV, Waliyar F; Ming L. Thorgeirsson S, Gail M, Lu P, Harris C, Wang N, et al).

Para evitar el efecto nocivo de las AF, se debe evitar la producción por parte del hongo, la detoxificación del alimento y bodegas contaminadas, y por último, la inhibición de la absorción de aflatoxinas en el TGI.

En México, la falta de experiencia, la creencia de que la cunicultura es una actividad fácil, la desleal comercialización de pío de cría, equipo o alimentos, la escasa cultura social respecto al consumo de carne de conejo y la falta de investigación para el desarrollo fueron los elementos que impidieron su expansión a mayor escala (Colin y Lebas 1992). El estudio de la aflatoxicosis en conejos tiene importancia debido precisamente al pequeño tamaño de las granjas dedicadas a la cunicultura. La limitación de terreno les impide producir su propio alimento, y por lo tanto están obligados a adquirir y almacenar

alimentos balanceados provocando la posibilidad del contagio. En el altiplano, en donde se ubican la mayor parte de las granjas, como ya quedó asentado, los almacenes de alimento no deberían guardar granos por mas de dos semanas, la época de lluvias en verano y las temperaturas cálidas del mismo favorecen el desarrollo de los *Aspergillus spp.* productores de AF. Si la cantidad de AF es muy alta en los alimentos almacenados, puede ocurrir un brote de aflatoxicosis con una creciente mortalidad de animales de engorda recién destetados, con posibilidades de hacer llegar al consumidor final que es el ser humano carne contaminada.

## **CAPITULO 6. CONCLUSIONES**

En base a la administración de dietas contaminadas con AFB1 (Metabolito secundario del hongo *A. flavus*) a conejos, se logró evidenciar y analizar el daño y las lesiones que dicho metabolito ocasionó al animal, mediante el uso de MEB, apoyando el resultado con MO y MC. Los estudios realizados de histopatología crearon condiciones viables y asertivas para poder realizar mejores estudios con lo que se logró trazar una guía que permitió saber hacia dónde mirar; la MEB cimentó la base de todos estos resultados. Por ejemplo lo que se observa en la *Figura 7* del presente trabajo, es una discontinuidad de vellosidades, vellosidades recortadas, epitelio desprendido, congestión vascular en epitelio, reacción celular y desnaturalización de proteínas que son precisamente deterioros causados por los efectos nocivos de las AF, el *Cuadro 4* determina la severidad y la incidencia con la que estos efectos se presentaron en las muestras. Todo este daño estaba poco documentado y solo era posible constatarlo a través de la ME.

Con este trabajo, entonces, se cumplió el objetivo de evaluar el daño que causan las AF en el intestino del conejo, con la observación de considerables efectos tóxicos provocados por la contaminación del alimento con dosis bajas de AF, dichos efectos se detectaron y confirmaron con el uso de ME, MO y MC, herramientas modernas y útiles que dieron muy buenos frutos. Un buen número de estas evidencias ofrecieron a la investigación una muy puntual y

concluyente certidumbre, ofreciendo con esto el futuro planteamiento de nuevas y mejoradas líneas de investigación que ofrezcan soluciones al problema tratado y se pueda así, dar un impulso importante al ámbito de la cunicultura en México, ya que esto puede traer beneficios económicos.

La presente tesis no es solo un logro profesional es también un paso en la búsqueda de resultados que puedan plantear a productores nacionales y extranjeros, investigadores y autoridades una prueba de las consecuencias que trae consigo la contaminación del alimento por AF, no solo para uso animal sino también por el impacto que tienen estos animales, ya que en muchas comunidades de diferentes países son una base para la alimentación de muchas personas y esto por supuesto habla, de un posible riesgo a la salud humana si se consume animales expuestos a estas toxinas.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Accensi F, Cabañés FJ. Hongos productores de micotoxinas emergentes. Rev Iberoam Micol S-63-S68 (2000).
- Bhat RV. Risk to human health associated with consumption of groundnuts contaminated with aflatoxins In Aflatoxin contamination of groundnuts: Proceedings of the International Workshop 6-9 october ICRISAT Center, Patancheru, India (1987).
- Bouxadé, C.: (1996) Producción cunicula y avicola alternativa. México D.F.
- Campos, J.: (1994) Lugar de origen del conejo. Rev. Cunicultura . Vol. XIX-108, pp 73. Barcelona España.
- Castellanos, y col.: (1996) Modelos de desarrollo agropecuario en México, Reporte de investigación, PIHAAA, CIESTAM N° 27, Universidad Autónoma de Chapingo, Texcoco, México.
- Chavéz L.: (1994) "Evaluación de Aspecto Zootécnico de la Cunicultura, en Amecameca Estado de México. Tesis FMVZ. UAEM Toluca, México.

- Cheeke, R. P.: (1995) Alimentación y Nutrición de conejo. Zaragoza España.
- Climent, J. B.: (1977) Teoría y práctica de la explotación del conejo. México D.F.
- Colin, M., Lebas, F.: (1992) Situación actual de la producción mundial de carne de conejo, Rev. Cunicultura, vol XVII – 99, Barcelona, España.
- Davegowda G and Munthy TNK, Mycotoxins their effects in poultry and some practical solutions in Mycotoxins Blue Book, ed by Diaz DE, Nottingham University Press. Nottingham, pp25-56 (2005).
- De Blas, C: (1988) Alimentación del conejo. Madrid España.
- Díaz G.J.(1996)Micotoxinas y Micotoxicosis en la Salud Humana y Animal, Primera parte. Veterinaria al día, pag. 28-34. Universidad Nacional de Colombia, Bogota.
- Díaz GJ, Calabrese E. Blain R. Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): an example of hormesis?. Poult Sci 2008; 87:727-732.
- Ellis WO, Smith JP, Simpson VK, Old Ham JH, Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism detection, out methods of control. Review. Crit Rev Food Sci Nutr 1991; 30:403-39.
- Fabila, A., y Fabila, G.: (1950) Anuario estadístico del Estado de México.
- Gabriela Gómez V. et al. Comportamiento productivo y respuesta inmune de pollos alimentados con dietas de soya con y sin aflatoxina y paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*). Téc Pecu Méx. 2009;47(3):285-297.
- Galtier P, Toxic effects of mycotoxins: importance of Biotransformation System en Nutritional Biotechnology in the Feed and Food industries. ed Lyons TP, Jacques KA, Proceedings of Alltech's Nineteenth Annual Symposium. Nottingham University Press (2003).
- Galvano F, Piva A, Ritieni A, Galvano G, Dietary strategies to counteract the effect of mycotoxins: a review. J Food protection 64(1): 120-131(2001).
- González G. Sofía, Ruiz Venegas Ma.Rosario, Hernandez B. Eliseo (2003) Guía de Microscopia Electrónica, 1ra. Edición, Universidad Nacional Autónoma de México. Pág. 31-34
- Hernández E. Tejada I, (2005) Efecto de las Aflatoxinas en Conejos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan UNAM.
- Hesseltine CW, Introduction, definition, and history of mycotoxins of importance to animal production en Interactions of Mycotoxins in Animal

Production. Proceedings of a Symposium, July 13, 1978 Michigan State University pp 3-18 (1979).

- International Agency for Research on Cancer (IARC). Some naturally substances: food items and constituents heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human, vol 56, IARC, Lyon. (1993).
- Leeson S, Dias G, Summer JD, Aflatoxins in Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins, University Books, Guelph, Ontario, Canada, pp249-298 (1995).
- Maertens, L: (1998) Primer congreso de cunicultura de las Américas "Nutrición y reproducción ". Septiembre. México D.F.
- Martínez, A. L.: (1997) Renace la cunicultura en México impulsada por el centro nacional de cunicultura, pp 38-44. Rev. Lagomorpha Asociación española de cunicultura. No. 8 Barcelona España.
- Mishra HN, Das C.A review on biological control and metabolism of aflatoxin. Crit Rev Food Sci Nutr 2006;43:145-264.
- NOM-188-SSA1-2002, Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias.
- Pawley JB (2006). *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed. edición, Berlin: Springer.
- Pier AC. Aflatoxicosis and Immunosuppression in Mammalian Animals in aflatoxin in Maiz. A Proceeding of the Workshop. El Batán, México: CIMMYT(1986).
- P. Surdeau, R. Henaff (1984) Producción de Conejos; 2da Edición, editorial Mundi Prensa, Madrid España.
- Q.F.B. M. en C. Zoila Irma Tejada C.1 y M.V.Z. M.S. Ph. D. Eliseo Hernández B. "Estudio en microscopía de barrido del intestino de pollos alimentados con dietas contaminadas con aflatoxinas y tratadas con *Flavobacterium aurianticum* y glucomananas de *Saccharomyces cerevisiae*" Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, 2006.
- Redy SV, Waliyar F. Properties of aflatoxin and its producing fungi. *Aspergillus and Aflatoxin in Groundnut* 2003 October.
- Steyn PS, Stander MA.(1999) Mycotoxins as casual factors of disease in humans. Bulletin of Health Organization: World Health Organization; 77 Ref No.0024
- Tejada CI, Río del JC, Hernández BE, Estudio de microscopía de barrido del intestino de pollos alimentados con dietas contaminadas con

aflatoxinas y tratadas con *Nocardia corynebacteroides*. Memorias del XI Congreso Nacional de la AMENA, I Congreso Latinoamericano de Nutrición Animal, 18-23 de agosto, Cancún, México, pp29-30 (2003).

- Tejada C.I. Biodetoxicación de ingredientes y alimentos para animales contaminados con aflatoxinas, UNAM Cuautitlan 2007.
- Wogan GE, Newberne PM . Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat. *Cancer Res* . ; 27: 543(1967).
- [www.nikon.com.mx](http://www.nikon.com.mx)
- [www.carlzeiss.com.mx](http://www.carlzeiss.com.mx)
- [www.cannon.com](http://www.cannon.com)