



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Título:

**ALTERACIONES MORFOPATOLÓGICAS EN POLLOS DE ENGORDA
ALIMENTADOS CON AFLATOXINAS Y/O FUMONISINAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

Ernesto Vanegas Sánchez

ASESOR:

DR. JUAN CARLOS DEL RÍO GARCÍA

COASESORES:

DR. ERNESTO MORENO MARTÍNEZ

DR. GUILLERMO VALDIVIA ANDA

Cuautitlán, 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

2. Resumen	3
3. Antecedentes	4
4. Introducción	5
4.1.a. Contaminación de la materia prima por microorganismo	7
4.1.b. Efectos tóxicos en los animales	7
4.1.c. Casos de contaminación en México	9
4.2. Aflatoxinas.	10
4.3. Contaminación de alimentos por aflatoxinas.	13
4.4. Efecto de las aflatoxinas.	14
4.4. a. Lesiones.	17
4.4.b. Toxicidad.	17
4.4.c. Citotoxicidad.	18
4.4.d. Efectos inmunosupresores	18
4.4.e. Mutagenicidad.	19
4.4.f. Carcinogenicidad.	19
4.4.g. Teratogenicidad.	20
4.4.h. Control de las aflatoxinas.	20
4.5. Fumonisisnas.	21
4.5.a. Mecanismos de acción.	22
4.5.b. Inmunodepresión.	24
5. Justificación.	25
6. Hipótesis.	26
7. Objetivo.	26
8. Materiales y métodos.	27
9. Diseño experimental.	29
10. Resultados.	30
11. Discusión.	35
12. Conclusión.	36
13. Literatura citada	37

2. RESUMEN

Se utilizó al pollo de engorda como modelo de estudio para evaluar el efecto del consumo de aflatoxinas (3 mg AFB/kg de alimento) y fumonisinas (1 mg FB/kg de alimento), de forma individual o combinadas. Los indicadores evaluados fueron el peso relativo de órganos y morfología de bazo, bolsa cloacal, hígado y riñón), así como las concentraciones séricas de proteínas, transaminasas (ALT y AST) y bilirrubinas al día 21 y 28 de edad. En la última semana recibieron alimento con micotoxinas, la finalidad de realizar este manejo fue la de evaluar el efecto residual de las micotoxinas. En este estudio se observó que la presencia de AFB+FB disminuye el peso de las aves ($p<0.05$). Respecto al peso relativo de hígado, riñón y bazo éstos se ven afectados en presencia de algún tipo de micotoxina o su combinación respecto al testigo ($p<0.05$). En este estudio se observa que la combinación de aflatoxinas y fumonisinas incrementan el daño a los tejidos, a pesar que la concentración reportada para causar daño con fumonisina es de 80 mg/kg de alimento.

3. ANTECEDENTES

Las micotoxinas son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios de origen fúngico caracterizados por presentar una elevada toxicidad, tanto para el hombre como para los animales, toxicidad que puede variar desde el desarrollo de actividades carcinógenas, teratógenas o mutágenas, hasta la producción de desórdenes de tipo hormonal o inmunosupresor, dependiendo de la micotoxina considerada(1).

La ingestión de micotoxinas reduce la productividad de especies pecuarias y disminuye la calidad sanitaria de productos derivados (2, 3). Como consecuencia, se han estimado pérdidas económicas cerca de 140 millones de dólares en 1986 sólo por la disminución en peso de pollos de engorda que consumieron niveles bajos de micotoxinas en Estados Unidos (3). Asimismo, se han reportado pérdidas económicas en países de Asia, Europa y Sudamérica (4).

Las aflatoxinas también se alojan en los tejidos de los animales que consumen alimentos contaminados. En 1971 Keyl y colaboradores, describieron los efectos que las aflotoxinas tenían en la alimentación del ganado y de las aves (3). En la década de los ochentas, con métodos y técnicas más modernas y precisas para la detección y cuantificación de las aflatoxinas, ha sido posible detectar con seguridad las aflatoxinas en los tejidos y fluidos del hombre y de los animales que las ingieren en sus dietas (4, 5, 6,7)

4. INTRODUCCION

La evolución favorable de la economía mexicana aunada al acelerado desarrollo demográfico, ha demandado un aumento en la cantidad de productos alimenticios, dentro de los cuales, la producción de carne favorece un crecimiento en la ganadería mexicana, siendo la avicultura una de la de mayor importancia. La avicultura ha representado una de las principales actividades del sector agropecuario del país, por la contribución que realiza a la oferta de productos, así como su participación en la balanza comercial, donde los patrones culturales de consumo han hecho que la carne de pollo sea uno de los principales ejes ordenadores de la demanda y de los precios de las demás carnes (8).

El sector avícola mexicano participa con el 63.54% de la producción pecuaria; 33% aporta la producción de pollo, 30.1% la producción de huevo y 0.20% la producción de pavo. En los últimos 5 años la participación en el PIB pecuario se ha incrementado anualmente en 5%. En el 2008 se produjeron cerca de 2, 853,228 millones de toneladas de carne de pollo, muy por encima de los demás cárnicos, la producción de huevo fue de 2, 306,744 millones de toneladas y la de pavo 14,974 toneladas. (9)

De 1994 al 2008 el consumo de insumos agrícolas ha crecido a un ritmo anual de 3.9% y cabe destacar que la avicultura es la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal. México cuenta con una parvada de más de 131 millones de gallinas ponedoras, 260 millones de pollos al ciclo y 935 mil pavos por ciclo. La producción de pollo en México, durante el periodo de 1994 a 2008 ha aumentado a un ritmo de crecimiento anual del 5.5% (9). El 90% de la producción de carne de pollo en México durante 2005, se concentró en 10 estados, localizados principalmente en el centro del país, donde se encuentran los principales centros de consumo. Cinco estados: Veracruz, Querétaro, Aguascalientes, Jalisco, y la Región Lagunera concentran el 51% de la producción (9).

En México las importaciones de carne de ave de 1994 a 2005 crecieron a una tasa promedio anual de 7% pasando de 239 mil toneladas en 1994 a 503 mil en 2005 (9).

En México el consumo per-cápita de pollo ha aumentado de 25.7 Kg. en 2007 a 26.15kg. durante 2009 lo que representa un incremento. Existen diversos factores que favorecen el consumo de carne de pollo en nuestro país:

- a) Más puntos de venta cada vez más cerca del consumidor (9).
- b) Confianza en la calidad de los productos (frescura) (9).
- c) Incremento de restaurantes de comida rápida (9).
- d) · Producto de alta calidad a precios accesibles (9).
- e) Tendencia de consumo hacia carnes con bajo contenido de grasa (9).
- f) Carne que permite diferentes variedades de preparación. Desde 1997 el pollo es la carne más consumida por el mexicano, actualmente representa casi el 50% del consumo de carnes en el país (9).

El pollo en México se comercializa principalmente en canal, por tipo de distribución o presentación es: vivo en 28%, rosticero 26%, mercados públicos 25%, en supermercados 7%, en partes el 10% y productos de valor agregado 4% (9).

Al igual que en otras ramas de la producción ganadera, el aumento de los volúmenes de producción avícola conlleva al crecimiento de su consumo de alimentos balanceados y por tanto, de granos forrajeros y pastas de oleaginosas, que conforman parte fundamental de las dietas aplicadas para obtener los mayores niveles de productividad, aprovechando para ello el potencial productivo que la mejora genética confiere a las aves de engorda. Sin embargo, existen una serie de factores que modifican la calidad tanto nutritiva como organoléptica de los alimentos traduciéndose en deficiencias y pérdidas en la producción animal, de estos factores podemos mencionar: contaminación por insectos, bacterias, virus, sustancias químicas y/o metabolitos producidos por hongos toxigénicos (10,11). La contaminación de alimentos agrícolas y pecuarios con metabolitos secundarios (micotoxinas) producidos por hongos, constituye un problema sanitario a nivel mundial, Árpád y Radomir (1999) (5) mencionan que se han aislado e identificado cerca de 100,000 especies de hongos, de los cuales 400 pueden ser considerados potencialmente tóxicos y solo el 5% son hongos conocidos productores de toxinas causando problemas de micotoxicosis humana y animal en varias regiones del mundo. De la gran variedad de hongos existentes en los diversos ecosistemas, los principales géneros que producen micotoxinas son *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, siendo las especies más reconocidas *Aspergillus flavus* Link; *Aspergillus parasiticus* *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium niger*, que sintetizan toxinas altamente hepatotóxicas, nefrotóxicas, inmunodepresoras y cancerígenas para los animales domésticos y seres humanos. La mayoría de estas micotoxinas son compuestos policetónicos resultantes de las reacciones de condensación que tienen lugar cuando se interrumpe la reducción de los grupos cetónicos en la biosíntesis de los ácidos grasos realizada por los hongos, estos ácidos grasos son metabolitos primarios los cuales son utilizados como reservorio de energía (13, 11, 14).

4.1. a. Contaminación de la materia prima por microorganismos.

Los granos y las semillas, por otra parte son invadidos por hongos cuyo hábitat natural no es el campo sino el almacén (bodegas, silos y trojes), siendo principalmente especies de *Aspergillus* y *Penicillium* (14). De manera que los hongos presentes en los granos y semillas han sido divididos en dos grupos, “hongos de campo” y “hongos de almacén”, existiendo un tercer grupo denominado “hongos de deterioro avanzado”. Este grupo incluye a los que colonizan granos y otros productos alimenticios que han sufrido un deterioro biológico previo (15).

La principal diferencia entre los “hongos de campo” y “hongos de almacén” es la cantidad de agua que requieren para su crecimiento y desarrollo. Las humedades relativas para hongos de campo están entre 90 y 100%, mientras los de almacén pueden crecer en humedades relativas de 65 a 90%, condiciones muy frecuentes en el almacenamiento de granos. En el caso de los “hongos de deterioro avanzado” estos proliferan en productos almacenados con humedades relativas superiores a 90% y poseen la característica de ser excelentes degradadores de materia orgánica. (15)

Algunos hongos de campo ponen en peligro la salud de los animales domésticos y la del hombre, ya que ciertas especies producen sustancias tóxicas, que por su origen se les ha denominado micotoxinas y micotoxicosis a las intoxicaciones que causan cuando se ingieren. Las micotoxinas más estudiadas son las producidas por *Aspergillus flavus* y son conocidas como aflatoxinas (15).

Especies de *Aspergillus* y *Penicillium*, son causantes de diversos daños a granos y semillas almacenadas, siendo los más sobresalientes la reducción del poder germinativo, el ennegrecimiento de granos y la producción de micotoxinas. Se ha encontrado que estas especies invaden a los granos desde el campo. En el caso de la invasión por *A. flavus*, generalmente está relacionada a periodos extremos de sequía y con el ataque de insectos a la mazorca; condiciones que favorecen la entrada de este hongo al hacer más vulnerables a los granos de maíz (16).

4.1.b. Efectos tóxicos en los animales.

Los efectos tóxicos de las micotoxinas comúnmente observados en animales incluyendo desde mala absorción de nutrientes hasta la muerte, se podría afirmar que los signos comunes por intoxicación con micotoxinas son: disminución de las ganancias de peso, debidas esencialmente

a una disminución de la síntesis de proteína y ácidos nucleicos; disminución en el consumo de alimento y por lo tanto de la eficiencia alimenticia; reducción de la respuesta inmune, en aves disminución en la producción y calidad de los huevos, algunas de las micotoxinas son tumorigénicas, mutagénicas. Se podrían clasificar algunas por los daños más comunes que hacen a las aves de la siguiente manera:

Daño al hígado: aflatoxinas (AF), citrinina, fumonisinas

Daño al riñón: ocratoxinas (OA), citrinina (CI), oosporicina (OO)

Sistema nervioso: fumonisinas (FBI), ácido ciclopiazónico (ACPZ), frot

Sistema reproductivo: zearalenona (ZEA)

Sistema cardiovascular: ergotamina (ERG), Ac. Fusárico

Daño a piel, membranas, eritrocitos: Af, Tricotricos (TCT), ACPZ

Organos linfoides, bolsa de Fabricio, timo, linfocitos y bazo (Af, TCT, OA). Los TCT incluyen toxinas como toxina T2, Deoxinivalenol (DON), Nivelenol (NIV), Diacetoxisxirpenol (DAS), producidas por hongos de diversos géneros, principalmente *Fusarium*. Los animales por su parte muestran susceptibilidad diferente al efecto de las micotoxinas, debidas a la especie, algunas son muy tóxicas para algunos animales y otros muestran cierta resistencia; edad, entre más joven es el animal en todas las especies es más susceptible; estado fisiológico durante la gestación son aparentemente más sensibles; sexo, en algunas aves los machos son menos resistentes y aún entre estirpes en las aves se encuentran diferencias. Por ejemplo: Aflatoxina son más tóxicas para el pollo de engorda que para pollos Leghor, los pollos son moderadamente resistentes en comparación con los patos o con los peces.

El problema de las micotoxinas en alimentos para animales se complica además por la gran cantidad de hongos toxigénicos que hay, porque un solo hongo puede producir más de una toxina y una misma toxina puede ser producida por varias especies de hongos. Lo que nos lleva a considerar que en un alimento puede desarrollarse más de un hongo y haber más de una micotoxina, sin embargo, la presencia del hongo en un alimento no significa que haya micotoxinas, ya que deben reunirse ciertas condiciones durante el crecimiento de los hongos, para que se produzcan estos metabolitos secundarios.

Por todo lo anterior hay que considerar las interrelaciones que hay entre las micotoxinas y su efecto sobre la salud de los animales, estas pueden ser: sinérgicas, aditivas, antagónicas y potencial, por ejemplo:

AF + T2 es sinérgica

OA + T2 es sinérgica

OA + Ac. Penicilico es sinérgica

Af + DON es aditiva

Af + Ac. Ciclopiazonico es aditiva

Af + OA en pollos se observan cierto efecto antagónico

FBI + Af efecto no es aditivo ni sinérgico

FBI + Moniliformina es aditiva

FBI + Toxina T2 es aditiva

Los animales que consumen alimentos con micotoxinas, disminuyen su efecto tóxico depositándolas en algunos órganos como el hígado y riñón, en músculos o eliminándolas con la orina y heces o a través de la leche y huevos, con lo cual se afecta no solo su cría sino también al hombre consumidor de productos de origen animal (17).

4.1.c. Casos de contaminación en México.

En estudios realizados por Ochoa *et al.* (1989) en el estado de Sonora, encontraron que de 66 muestras de maíz y 137 muestras de trigo analizadas, el 20% presentó contaminación con AFB₁, pero solamente el 6.1% presentó valores por arriba del máximo permitido por la FDA (por sus siglas en inglés Food and Drug Administration) de los Estados Unidos, que establece un valor máximo de 20 ppb. Sin embargo la norma oficial mexicana NOM-188-SSA-2002 establece parámetros más amplios en pollo de engorda se establece que es permitido 100 µg como rango máximo. El nivel más alto encontrado fue de 45 ppb, y fueron detectadas en la zona sur del estado, en granos almacenados a la intemperie (17).

Un problema de micotoxicosis se presentó en el estado de Sonora en 1984, causando mortandad en pollos y la incidencia de abortos en cerdas. Las causas que originaron este problema fueron atribuidas al consumo de alimentos elaborados con granos contaminados por micotoxinas (60).

Las autoridades de nuestro país deben insistir por ello en hacer determinaciones de aflatoxinas; sin embargo, este tipo de pruebas son costosas, y pueden llegar a ser complicadas ya que sólo existen trazas de estas sustancias en las muestras, especialmente en alimentos destinados para consumo animal (33).

4.2. Aflatoxinas.

En 1960, murieron 100,000 pavitos en Inglaterra de una causa “misteriosa”. La mortandad fue asociada con diferentes lotes de alimentos, y todos ellos tenían un ingrediente en común, harina de cacahuate de una sola fuente de procedencia (19). La investigación permitió concluir que la causa de la muerte de las aves era una sustancia producida por el hongo *Aspergillus flavus*, por lo que a estas sustancias se les llamó aflatoxinas (18).

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos secundarios, producidos por *Aspergillus flavus* Link y *Aspergillus parasiticus* Speare. Las principales aflatoxinas son cuatro: AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂. Generalmente AFB₁ es encontrada en mayores concentraciones que las otras y es la más potente, siendo carcinógena, teratógena y mutágena, y el órgano que más afecta es el hígado, por lo que es considerada una hepatoxina (15). *Aspergillus flavus* produce además ácido aspergílico, aspertoxina, esterigmatocistina, fisicon y flavotoxinas entre otros compuestos (20).

Químicamente las aflatoxinas son difuranocumarinas (21), estos compuestos están formados por anillos heterocíclicos, los furanos relacionados a la toxicidad y un anillo de lactona responsable de la fluorescencia y el cual también hace que estos metabolitos sean susceptibles a la hidrólisis alcalina (figura 1) (22). Las letras B y G se refieren a los colores azul y verde de fluorescencia observados bajo luz ultravioleta de onda larga; esta propiedad de fluorescencia de las aflatoxinas ha llegado a ser la base para la cuantificación por métodos fisicoquímicos (23); y los números se refieren a los patrones de separación de estos compuestos al utilizar cromatografía de capa fina (24).

Las aflatoxinas se generan por la vía biosintética de los poliquétidos a partir de acetatos y se consideran los contaminantes biológicos de los alimentos más extendidos a nivel mundial y los más peligrosos que se conocen debido a sus propiedades cancerígenas, mutágenas y teratógenas (25).

Desde entonces numerosas investigaciones se han hecho acerca del efecto de las aflatoxinas en la salud de los animales domésticos, en los cuales se ha detectado baja ganancia de peso, desarrollo lento, problemas en la reproducción, diarrea, desórdenes respiratorios, hemorragias, reducción en la producción de leche y huevos; así como la alteración del sistema inmunológico, con el consecuente incremento en el desarrollo de infecciones por bacterias, virus, y otros agentes causantes de enfermedades, lo cual incluso ocasiona la muerte de los animales (29 , 30).

Existen evidencias respecto a la ingestión de alimentos contaminados con aflatoxinas y el desarrollo de cáncer en humanos, particularmente en regiones cálidas y húmedas, principalmente India, seguido por otros países asiáticos y africanos. La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (por sus siglas en inglés IARC), en 1987 consideró que las aflatoxinas eran sustancias con alto poder cancerígeno en humanos. En estudios hechos en Kenya, así como en Tailandia, se ha encontrado una correlación positiva entre la ingestión de aflatoxinas y el desarrollo de cáncer en el hígado (31). También hay evidencias de que las partículas de grano y el polvo en el aire pueden estar contaminados con aflatoxinas, que al ser inhalados pueden causar cáncer pulmonar (36); esto es importante para la salud de los trabajadores que están expuestos al manejo de granos contaminados con estas toxinas (32).

La producción de aflatoxinas depende de varios factores: la cepa del hongo; el substrato; el contenido de humedad; la temperatura y la micoflora asociada. Las aflatoxinas son producidas sólo por algunas cepas denominadas toxígenas, cuyos requerimientos son especiales para su desarrollo, por ejemplo: una actividad de agua mínima de 0.85, equivalente a 16.5% de humedad en cereales como el maíz, en cuanto al límite de humedad máximo, prácticamente no existe; puesto que en los laboratorios se pueden producir aflatoxinas aún en medio líquido, siempre y cuando sean cultivos puros (32).

En cuanto a la temperatura mínima para la producción de aflatoxinas es de 12°C, la óptima de 27-30°C y la máxima de 40-42°C. *A. flavus* crece lentamente a temperaturas menores de 12°C, y rápidamente a temperaturas hasta de 55°C; pero no produce aflatoxinas debajo de 12°C, ni arriba de 40-42°C (31).

4.3. Contaminación de los alimentos con Aflatoxinas.

Estados Unidos es el principal productor de granos en el mundo; sin embargo, la cosecha estadounidense de granos en 1992 fue realizada en condiciones muy húmedas y consecuentemente los granos fueron más susceptibles a ataque por hongos (33). Mientras que en México la producción de granos es un tanto deficiente y su comercialización ineficiente, situaciones que obligan a contar con mayores cantidades de granos almacenados; sin embargo, en estudios realizados se comprobó que cuando el almacenaje del grano se incrementó de 15 a 22 días, la contaminación con aflatoxinas se incrementó cuatro veces (33).

El maíz contaminado de Estados Unidos que llega a México, aunque se tiñe para diferenciarlo y que se usa sólo para consumo animal, muchas veces es destinado también para consumo humano, al que no debe ir dirigido. Durante el año de 1993 ocurrió que el maíz destinado a corrales de engorda, fue utilizado en vacas lecheras y cerdos de pie de cría, con efectos devastadores y gran peligro para los humanos al consumo de estos alimentos (33).

Las aflatoxinas son contaminantes de los alimentos en muchas áreas del mundo, y están constantemente presentes en los granos (35). Las fuentes frecuentemente analizadas para la determinación del contenido de aflatoxinas son el maíz, cacahuates y productos a base de éstos, leche y alimentos para animales. Investigaciones acerca de la incidencia en alimentos como soya, cebada, avena, centeno y arroz han indicado que estos granos no son una fuente significativa de aflatoxinas, a menos que sean almacenados inadecuadamente. (34) En nuestro país, el sorgo es uno de los granos que están destinados casi en la totalidad a la alimentación animal, y se ha reportado hasta un 83.5% de contaminación por aflatoxinas en plantas procesadoras de alimento, la cosecha de este producto en México coincide con la época de tiempo lluvioso, lo que es determinante a elevadas posibilidades de contaminación por hongos, representando el principal responsable de la introducción de aflatoxinas en los alimentos para animales (36).

Hasta 1982 se creía que las aflatoxinas solo contaminaban a los cereales, nueces, fríjol, especias y productos de leche, pero en 1985 se reportó que las aflatoxinas también contaminaban trigo serranero, mantequilla de cacahuete, mantequilla de fríjol, conservas de fríjol, chile, aceite de cacahuete, nuez moscada y queso. Otros de los alimentos en los que también han sido detectadas las aflatoxinas son: aceite comestible, carne de res, cerdo, pollo, hígado de cerdo, huevo, fruta seca, té, semillas de café, cacao y otros (37).

4.4. Efecto de las Aflatoxinas.

En cuanto a su importancia, se sabe que prácticamente todos los seres vivos son susceptibles a las aflatoxinas. *A. flavus* está adaptado a emplear un amplio espectro de fuentes orgánicas, además de ser saprofito, es un organismo patógeno oportunista en plantas, insectos, vertebrados, incluyendo al hombre y animales domésticos (31); sus efectos pueden ser agudos o crónicos dependiendo del organismo afectado, la dosis y frecuencia de exposición (32).

La sensibilidad varía con las especies, edad y sexo en los animales, así como la composición de la dieta y la ruta de ingestión (39); algunas bacterias se inhiben en su presencia, algunas plantas desarrollan albinismo, las semillas pierden capacidad de germinación y el grado de toxicidad varía de acuerdo a las especies de animales (40).

La absorción de aflatoxina B₁ (AFB₁) después de una administración oral resulta relativamente eficiente y es totalmente dependiente de la especie animal, siendo en general completa. Por otro lado, está demostrado que la absorción de AFB₁ a nivel del intestino delgado es mediante difusión pasiva y dependiente de la composición lipídica del epitelio intestinal, sin perder de vista que en el tracto gastrointestinal puede llevarse a cabo una biotransformación, generando AFB₁-epóxido, dihidrodiol-AFB₁ o AFB₂ capaces de interactuar con proteínas intestinales (41).

Las aflatoxinas son consideradas como genotoxinas, ya que pueden unirse al ADN de su hospedero y que pueden activar elementos genéticos móviles: provirus y retrovirus del genoma, generando una desestabilización del mismo que conduce a distintas anormalidades (40). De todas las aflatoxinas la AFB₁ se considera la más tóxica y en orden decreciente le siguen: AFG₁, AFB₂, AFG₂, AFM₁ y AFQ₁ (42).

En general, la biotransformación de cualquier agente genotóxico, se lleva a cabo principalmente en el hígado por enzimas microsomales. Sin embargo, también puede realizarse en otros tejidos u órganos como el riñón, los pulmones, la placenta, e incluso en sangre. Cabe mencionar que es probable que existan otras reacciones de biotransformación en las cuales intervienen enzimas no microsomales (41).

La presencia de aducto (es un producto (AB) formado por la unión directa de dos moléculas A y B, sin que se produzcan cambios estructurales en las porciones A y B.) AFB₁-albúmina en sangre, es indicativo que la toxina fue metabolizada hasta epóxido ya sea en el

lumen del intestino, en la pared de éste o en sangre, y su presencia es usada como biomarcador de exposición a AFB₁ (41). En tanto, la conversión de AFB₁ a aflatoxicol se lleva a cabo mediante una reductasa citosólica. El aflatoxicol es considerado tan tóxico y carcinogénico como la AFB₁ aunque su mutagenicidad es sólo del 70% de ésta. De acuerdo con esto (41) (1980) propusieron la hipótesis de que el aflatoxicol puede permanecer como “reservorio” de AFB₁ *in vivo*. Desde el punto de vista bioquímico las aflatoxinas son consideradas como inhibidores biosintéticos y en el caso de la AFB₁ se ha encontrado que su actividad biológica tiene varias fases: 1) interacción con el ADN e inhibición de las polimerasas responsables de la síntesis tanto de ADN como ARN; 2) Supresión de la síntesis del ADN; 3) Reducción de la síntesis del ARN e inhibición del ARN mensajero; 4) alteraciones en la morfología del nucléolo y 5) reducción de la síntesis de proteínas (43).

Bioquímicamente, las aflatoxinas pueden alterar el metabolismo de carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, así como el energético. Las aflatoxinas pueden ser consideradas como inhibidores biosintéticos tanto *in vitro* como *in vivo*. Altas dosis pueden provocar una inhibición total de los sistemas bioquímicos, y dosis bajas pueden afectar diferentes sistemas metabólicos (43).

Diversos estudios han demostrado que los niveles de glucógeno hepático se reducen por la acción de las aflatoxinas, esto puede deberse al efecto sobre la inhibición de la glucogénesis, la disminución en el transporte de glucosa hacia las células hepáticas y la aceleración de la glucogenólisis dando lugar a la apoptosis. Sin embargo, tanto la síntesis de lípidos como el transporte a través de la célula son incrementados (43).

La apoptosis puede ocurrir, por ejemplo, cuando una célula se halla dañado y no tiene posibilidades de ser reparada, o cuando ha sido infectada por un virus. La decisión de iniciar la apoptosis puede provenir de la célula misma, del tejido circundante o de una reacción proveniente del sistema inmunológico (34).

Cuando la capacidad de una célula para realizar la apoptosis se encuentra dañada (por ejemplo, debido a una mutación), o si el inicio de la apoptosis ha sido bloqueado (por un virus), la célula dañada puede continuar dividiéndose sin mayor restricción, resultando en un tumor, mismo que puede ser un tumor canceroso (30).

La muerte celular programada es parte integral del desarrollo de todo tipo de tejidos vivos y no provoca la respuesta inflamatoria característica de la necrosis. En otras palabras, la

apoptosis no se parece al tipo de reacción resultante del daño a los tejidos debido a infecciones patogénicas o trauma. En lugar de aumentar su tamaño y estallar derramando así posible material dañino al espacio intracelular, la célula en proceso de apoptosis compacta su material nuclear y se fragmenta. De esta manera, pueden ser eficientemente englobadas vía fagocítica y consecuentemente, sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente (30).

En contraste con la mayoría de las micotoxinas, la AFB₁ no es un carcinógeno, pero requiere de una biotransformación para ejercer su acción. La parte activa de la molécula de AFB₁ se atribuye al dihidrofurano, ya que la pérdida de la doble ligadura en C₂-C₃ del furano terminal resulta en una fuerte disminución de la actividad tóxica.

La unión de la aflatoxina al ADN (aducto) se da en varios pasos: 1) Intercalamiento de la toxina en la estructura helicoidal del ADN; 2) Oxidación de los carbonos no saturados (C₈ y C₉) de la parte terminal furano de la molécula de AFB₁ por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta (organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unidas al citocromo P-450) para formar un intermediario y 3). El ataque del C₈ de AFB₁ sobre el N₇ de la guanina y la formación de una ligadura covalente en la interacción AFB₁- N₇- Guanina. El daño en la molécula de ADN por esta interacción se manifiesta de varias maneras; el aducto es cortado de la molécula de ADN y se inducen errores en el mensaje o bien, el aducto no es cortado pero es convertido en AFB₁-formamidopirimidina que también es causante de errores en la transcripción. Como consecuencia en el daño del ADN se origina la mutagénesis y carcinogénesis y si se trata de un feto se presenta la teratogénesis (46).

Además de la inhibición de la replicación del ADN, de la síntesis de ARN y proteínas, la AFB₁ origina un efecto en las membranas del retículo endoplásmico y en la fosforilación oxidativa interfiriendo en la cadena respiratoria mitocondrial, concretamente en los citocromos b y c. El metabolismo de los carbohidratos también se ve afectado, inhibe la síntesis de glicógeno a través de la acción sobre las enzimas glicógeno sintetasa y transglicosilasa. Otro de los problemas que ocasionan las aflatoxinas es el de incrementar el nivel citosólico del NADPH necesario para la síntesis de ácidos grasos, por lo que se produce una acumulación de lípidos en el hígado (42).

Hay estudios considerables para la hipótesis que la fumonisina induce la interrupción del metabolismo del sfingolípidos es un acontecimiento importante en la cascada de los eventos que conducen al crecimiento alterado de la célula, diferenciación, y lesión que se observó ambos

in vitro e in vivo (42).

El metabolismo alterado del ácido graso en ácidos grasos esenciales del hígado en componentes importantes de todos los glicerofosfolípidos, sfingolípidos, y triglicéridos de la membrana de la célula. Aparte de ser componentes estructurales de todas las membranas, son precursores de eicosanoides, de prostaglandinas, de leukotrienos, y de otros derivados oxigenados. Los fosfolípidos de membrana son importantes en muchos sistemas de señalización intracelular conocidos en la regulación del crecimiento, muerte, y diferenciación de la célula.

Una vez que estén acumuladas, las bases libres del sfingolípidos puedan persistir en los tejidos finos (especialmente riñón) mucho más de largo que la fumonisina B1 (42).

4.4.a. Lesiones.

Las primeras lesiones observables de aflatoxicosis son la necrosis hepática y cambios grasos. La inducción de cáncer hepático es común en ratas, truchas y cerdos. En aves se producen diversas reacciones que van desde una mala absorción de nutrimentos, coagulopatía, desarrollo ineficiente, vulnerabilidad a las infecciones, incapacidad para reaccionar a las vacunas, problemas reproductivos, etc. En mamíferos producen necrosis y disfunción hepática, y extensas lesiones hemorrágicas que resultan letales (40). En el hombre las intoxicaciones están asociadas con cáncer digestivo, hepatomegalias, hígado graso, cirrosis y además producen diarreas, vómitos, abortos y son causantes de inmunodepresión y hemorragias internas (40).

4.4.b. Toxicidad.

La toxicidad de las aflatoxinas está ampliamente investigada, esto obedece directamente a la repercusión en la salud humana, así como a las pérdidas materiales y económicas que puede ocasionar una intoxicación aguda como la descrita en los años 60's en pavos (48).

Las aflatoxinas son tóxicas, principalmente al hígado, dependiendo de la duración de la exposición y de la concentración, puede presentarse una toxicidad aguda o crónica (47 ,48).

La exposición crónica a niveles bajos de aflatoxinas es muy probable que ocurra con mayor facilidad que una exposición aguda. En la literatura, existen evidencias de que una exposición crónica a AFB₁ en animales de experimentación, produce cáncer e hipertrofia del hígado (48).

Los daños más frecuentes en el organismo por las toxinas son: en primer lugar hay inhibición del proceso de la síntesis de proteínas de las células, produciendo en hígado ictericia tóxica, se presenta por la lesiones de los hepatocitos (degeneración vacuolar, cambio de grasa, apoptosis) éstos pueden aún conjugar la bilirrubina, pero al estar inflamado los canalículos biliares se verían afectadas para el flujo de las bilirrubinas, la bilirrubina que se logre conjugar se absorbe por la sangre de nuevo y es filtrada por los riñones (48).

4.4.c. Citotoxicidad.

También está demostrado que la AFB₁ puede afectar el ciclo celular y la mitosis de algunas células, especialmente hepatocitos (39, 48).

La unión de la aflatoxina al ADN (aducto) se da en varios pasos: 1) Intercalamiento de la toxina en la estructura helicoidal del ADN; 2) Oxidación de los carbonos no saturados (C₈ y C₉) de la parte terminal furano de la molécula de AFB₁ por el sistema microsomal de oxidasas de función mixta (organización compleja de enzimas de las células hepáticas NADPH dependientes, unidas al citocromo P-450) para formar un intermediario y 3) El ataque del C₈ de AFB₁ sobre el N₇ de la guanina y la formación de una ligadura covalente en la interacción AFB₁- N₇- Guanina. El daño en la molécula de ADN por esta interacción se manifiesta de varias maneras; el aducto es cortado de la molécula de ADN y se inducen errores en el mensaje o bien, el aducto no es cortado pero es convertido en AFB₁-formamidopirimidina que también es causante de errores en la transcripción.(46).

4.4.d. Efectos Inmunosupresores.

Las aflatoxinas pueden afectar al sistema inmune celular y humoral, provocando un aumento en la susceptibilidad de los animales hacia enfermedades causadas por bacterias, hongos y parásitos. Además, pueden existir efectos inmunotóxicos sin observarse patologías clínicas aparentes, este efecto es mediado por el proceso de la síntesis de proteínas al estar afectado por las toxinas no podrá secretar las quimosinas de la inflamación y el complejo inmune (47, 48).

Respecto a las interleucinas se sabe que son citocinas que participan en la respuesta inflamatoria e inmune, y que las citocinas pueden ser secretadas por células del sistema inmune, como los macrófagos y los linfocitos. Otras citocinas, como IL-1, IL-6 e IL-8, son producidas

por células epiteliales como respuesta a infecciones bacterianas. Sin embargo, diversos investigadores mencionan que las micotoxinas son capaces de modular la producción de citocinas en órganos o tipos celulares diferentes (110). El daño celular (células degeneradas, en necrosis o apoptosis) impediría responder al estímulo de las micotoxinas, inhibiéndose, por tanto, la síntesis de IL-8. La disminución de IL-8 puede impedir el reclutamiento adecuado de células inflamatorias, aumentando la susceptibilidad intestinal a la invasión de agentes infecciosos (69).

4.4.e. Mutagenicidad.

Dentro de los bioensayos empleados para medir mutagenicidad de las aflatoxinas se pueden citar: detección de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, cultivos pulmonares embrionarios humanos, células de riñón de rata y hámster, células HeLa(células que sigue reproduciéndose), mutaciones en microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Neurospora crassa*, *Salmonella typhimurium*, *Drosophyla melanogaster*, células T de riñón humano, cultivo de leucocitos humanos e inducción de fagos en bacterias lisógenas. Los estudios de mutagenicidad en bacterias sugieren que el posible mecanismo de AFB₁ puede ser iniciado por un proceso de unión AFB₁ – ADN, llevando a la formación de puntos de unión en una misma cadena de ADN y con ello alterar la actividad de la ADN polimerasa (45).

4.4.f. Carcinogenicidad.

El desarrollo de un tumor se puede dividir en las siguientes etapas: iniciación, promoción y progresión. Además, las lesiones preneoplásicas y malignas en humanos están caracterizadas por la expresión de cambios enzimáticos, análogos a los observados en modelos animales con tumores en el colon, estómago, intestino delgado, esófago, cavidad oral, hígado, tejido pulmonar y glandular mamario(49).

La capacidad de las distintas aflatoxinas para inducir tumores en especies animales difiere considerablemente, siendo uno de los principales motivos la variabilidad en cuanto a su metabolismo, distribución y excreción, por lo que las cantidades mínimas necesarias para la inducción de cáncer son también dependientes de estas propiedades, sin perder de vista, además, la susceptibilidad relativa de cada especie animal (50).

4.4.g. Teratogenicidad.

Las aflatoxinas son capaces de interferir en el desarrollo normal de los fetos, y la respuesta depende del estadio de desarrollo del mismo, la cantidad consumida y grado de exposición. En mamíferos si la exposición se realiza durante la organogénesis activa (8 días) ocasiona la muerte fetal y/o la reabsorción de algunos de ellos, siendo posible observar malformaciones en los que logran sobrevivir. Si la toxina es aplicada después del 13° día, cuando la organogénesis está casi finalizando, no ocurre malformación, y la reabsorción y muerte in utero ocurre con baja frecuencia. (51) Puesto que es un potente inhibidor de la síntesis de proteínas en células eucarióticas, altera la diferenciación celular. La susceptibilidad a teratógenos varía grandemente durante el curso de la gestación, aunque el embrión es más susceptible durante los estadios tempranos de diferenciación morfológica (45).

4.4.h. Control de aflatoxinas.

Muchos países han emitido leyes las cuales limitan la cantidad permisible de aflatoxinas en los alimentos e incluso en los ingredientes de éstos (53). Sin embargo, la información sobre la ocurrencia de contaminantes es un punto estratégico para marcar decisiones que determinen la extensión de éstas, estableciendo o reforzando los límites regulatorios dependiendo de la disponibilidad de metodologías analíticas (53).

La seguridad en los alimentos es un aspecto en el cual debe hacerse más énfasis (52). La determinación de residuos de aflatoxinas en tejidos animales y productos (carne, leche, huevos y derivados de éstos), son esenciales para la regulación, control de calidad e investigaciones futuras. Algunos reportes indican que la concentración de aflatoxinas en tejidos y productos animales es generalmente baja; sin embargo, la significancia toxicológica con estos bajos niveles aún no está bien establecidos (53).

Muchos países regulan el nivel máximo permisible de aflatoxinas en alimentos, por ejemplo: Estados Unidos estableció 20 ppb, Canadá 15 ppb, Francia 10 ppb, Reino Unido 10 ppb, Japón 10 ppb, y Australia 5 ppb, mientras que en España los límites permitidos son de 10 ppb de la suma de AFB₁, AFB₂, AFG₁ y AFG₂, con un límite máximo de 5 ppb para AFB₁ por ser considerada la más tóxica de las cuatro. La legislación de residuos tóxicos en alimentos solo considera la presencia de las cuatro principales aflatoxinas producidas por *Aspergillus*, ignorando la presencia de los metabolitos en tejidos animales, que también pueden ser tóxicos aunque con menor potencialidad. (54)

La Administración de Alimentos y Drogas (por sus siglas en inglés, FDA) estableció niveles permitidos de aflatoxinas en varios alimentos y dietas para animales; sin embargo, no se establecieron límites para carne u otros tejidos animales destinados para consumo humano (53).

El análisis de las micotoxinas comprende una serie de pasos que inician con el muestreo, la extracción, purificación, separación y cuantificación de la toxina. La principal dificultad en el muestreo de granos o productos sospechosos de contaminación por micotoxinas es que éstas no se encuentran distribuidas de manera homogénea. Para el caso del maíz se ha encontrado que la muestra debe ser de 5Kg. En los últimos años se le ha dado gran importancia a la metodología para la toma de muestras, ya sea en el campo o después de la cosecha (18).

El control de estos hongos con sustancias químicas ha estado limitado, sin embargo son ampliamente utilizadas algunas sales del ácido propiónico, las cuales se utilizan para controlar los hongos durante el almacenamiento de maíz húmedo que se destina para la alimentación directa de bovinos (16). En México, para el caso de semillas se han probado fungicidas, que además de proteger la viabilidad de la semilla, evitan el ataque por hongos de almacén, sin embargo, por su toxicidad no son adecuadas para destinarlas a consumo humano (16).

4.5. Fumonisin.

Los hongos del género *Fusarium* sp están reconocidos mundialmente, ya que son capaces dependiendo de la especie, de metabolizar una serie de toxinas de diversa estructura química. Muchas de las especies toxigénicas de *Fusarium* son descritas como las mayores patógenas para plantas y cereales, causando por ejemplo “podredumbre de la mazorca de maíz”, así como para alimento utilizado para la alimentación animal (35). De las más importantes desde el punto de vista de salud animal y productividad están los tricotecenos, zearalenonas, moniliformina y fumonisina (55, 56). Las fumonisin son el grupo de micotoxinas más recientemente descubiertas y son producidas principalmente por *Fusarium moniliforme* la fumonisina B₁ (FB₁) es la molécula predominante producida por el hongo. La fumonisina ha sido asociada con ciertas enfermedades en animales como son la leucoencefalomalacia en equinos (LEME) y edema pulmonar porcino (EPP) (57,58). El mecanismo general de acción de las fumonisin es la disrupción de síntesis de esfingolípidos. Visconti *et al.*,(81) mencionan que son los compuestos que principalmente están en los cultivos fúngicos del maíz, habiéndose demostrado que se dan naturalmente en niveles biológicamente importantes en el maíz y en varios alimentos a base de maíz para seres humanos y alimentos en varios países de todo el

mundo. Por ejemplo en Filipinas, Tailandia e Indonesia se ha observado una contaminación del 50% de maíz. Los países africanos son los más afectados hasta un 90%, en estos países se han detectado niveles de fumonisina en maíz de 2000 ppb y en alimento para animales rangos de 4000 a 11000 µg/kg. Otros investigadores mencionan la presencia de fumonisina en Argentina, Costa Rica, Honduras, Venezuela y México, pero en cantidades que van de 1 a 15 ppb, afectando principalmente al maíz amarillo y en el 83% de las muestras analizadas (60, 59,57, 58). Existen evidencias de daño bioquímico, celular y morfológico en los animales que consumen alimento contaminado con fumonisinas, dentro de las alteraciones que se observan en equinos, cerdos, rumiantes y pollos se encuentran daño hepático, gastrointestinal, cerebro, pulmón y mortalidad, así como un efecto inmunodepresor al inhibir la replicación de células leucocitarias e inhibir la actividad fagocítica de los macrófagos, sin embargo la información es limitada respecto a los efectos de la fumonisina B1 sobre los pollos (61, 62). Las dosis que se han utilizado en los pollos de engorda experimentalmente son relativamente altas a las observadas de manera natural (0 a 5 mg/kg FB1) (85,84), observaron alteraciones en el peso corporal, peso de órganos y alteración en la química sanguínea al utilizar dosis de 300 y 400 mg/kg (ppm), similar a lo observado por Brown *et al.*, (1992)(64)(65), proporcionaron dietas contaminadas con fumonisina a patos con dosis de 5, 15 y 45 mg/kg de FB1 observando alteración en el desempeño productivo aún con la dosis más baja en comparación con el grupo testigo.

Entre las estrategias para controlar la contaminación por micotoxinas destaca el uso de adsorbentes o ligantes, tal es el caso de las arcillas y los aluminosilicatos de sodio y calcio hidratados (HSCAS), y más recientemente los de origen natural como los manano oligosacáridos, derivados de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* (La levadura de cerveza) (67).

4.5.a. Mecanismos de acción.

El riesgo potencial a la salud en humanos y animales expuestos a FBs puede estudiarse mediante biomarcadores presentes en orina, suero y tejidos, que asocian la exposición con la alteración del organismo. Estos estudios indican que la enzima clave del metabolismo de los esfingolípidos (Naciltransferasa de esfingina) es el blanco celular de la toxicidad y carcinogenicidad de las fumonisinas, dicha alteración incrementa la relación de los precursores esfingina (SA) y esfingosina (SO), los cuales son detectados en suero y orina previamente al daño en tejidos (20). Estudios realizados en cerdos, equinos y aves, demostraron que la relación SA/SO es un excelente biomarcador específico de daño por la toxicidad de la FB1 (71).

Es basado en la interacción de la micotoxina con esfingosinas, estructura básica de los esfingolípidos, sustancia que tiene varias funciones importantes en la integridad de la membrana celular de la mielina así como su actividad fisiológica. Con la inhibición parcial o total de las esfingosinas y de la enzima ceramida sintetasa ocurre hepatotoxicosis. (micotoxinas cerdos y aves).

Se ha demostrado que la fumonisina B1 causa inmunosupresión, neurotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad. La fumonisina B1 ha sido implicada como se ha indicado previamente en la leucoencefalomalacia equina y con el edema pulmonar del cerdo, origina hepatotoxicidad y nefrotoxicidad en roedores y cáncer esofágico en el hombre (cáncer esofágico endémico observado en Asia y África), por lo que es claro que la fumonisina B1 presenta un amplio riesgo para la sanidad animal y salud pública. En la población de la provincia de Transkei (Sudáfrica) se ha demostrado una correlación estadística muy alta entre el consumo de maíz contaminado y la incidencia de cáncer esofágico (Rheeder et al., 1992). Además la fumonisina B1 también se ha relacionado con un brote en la India de gastroenteritis por consumo de maíz y sorgo enmohecido conteniendo hasta 64 mg FB1/kg, con síntomas agudos, dolor abdominal y diarrea(71).

El papel carcinógeno de la fumonisina B1 (FB1) también puede estar asociado a su efecto inductor de enzimas microsomales hepáticas, principalmente de las subfamilias P4501A y P4502E. Por otra parte, existen datos que también sugieren que la FB1 puede actuar como un proliferador de peroxisomas; la FB1 induce la enzima peroxisomal palmitoil CoA oxidasa, la enzima trifuncional peroxisomal trans-2-enoil-CoA hidratasa, así como también induce enzimas microsomales hepáticas en particular de la subfamilia P4504A, por lo que podría comportarse como un agente carcinógeno epigenético y ser la base de la hepatotoxicidad y hepatocarcinogenicidad de la FB1, observadas principalmente en roedores. En ratas, la FB1 se absorbe a partir del tracto gastrointestinal; aunque la biodisponibilidad oral es baja, niveles significativos de FB1 se detectan en plasma; la razón AUC tejido/AUC plasma, (AUC= área bajo la curva) indica que la FB1 presenta afinidad por distintos tejidos, principalmente hígado y riñón(71).

Finalmente señalaremos que las fumonisinas son consideradas como posibles carcinógenos (clase 2B) según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer y que la Comisión Europea (2001) una PMTDI (provisional maximum tolerable daily intake) para las fumonisina B1, fumonisina B2 y fumonisina B3 (solas o en combinación) de 2 mg/kg p.c./día, a

0,2 mg/kg p.c./día y un factor de seguridad de 100. En EE.UU. la FDA recomienda en el alimento o pienso para équidos niveles no superiores a 5 mg/kg, lo que representa no más de un 20% del total de la dieta. (71)

4.5.b. Inmunodepresión.

La disminución en la síntesis de IL-8 (es una citocina de la familia de las quimiocinas, de naturaleza proinflamatoria. Su síntesis se realiza en fibroblastos, célula endotelial, monocito y macrófagos. Es un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, regula la producción de proteínas de adhesión y la formación de lípidos bioactivos amplifica la respuesta inflamatoria local). por acción de FB1 podría deberse al hecho de que FB1 presenta una estructura análoga a la de los esfingolípidos, lo que interferiría con la síntesis de todo el complejo(18). Investigaciones recientes indican que FB1 tiene acción sobre globósidos y gangliósidos, se sabe que estos últimos modulan la producción de inmunoglobulinas y la síntesis de citocinas (72).

5. JUSTIFICACION.

Tanto el maíz como el sorgo son granos ampliamente utilizados para la elaboración de alimento balanceado utilizados en la alimentación del pollos de engorda, ambos granos son susceptibles a los hongos tóxicos tales como *aspergillus* sp y *fusarium* spp. Es importante mencionar que la contaminación del alimento generalmente esta ocasionada por más de una micotoxina y que el efecto de interacción que presentan modifican las lesiones que si estuviera una sola micotoxina. Se han realizado diversos estudios entre aflatoxina y otras micotoxinas como ocratoxina y tricoteceno, sin embargo entre aflatoxina y fumonisina no ha sido estudiado en forma intensiva.

6. HIPOTESIS.

El efecto del consumo conjunto de aflatoxinas y fumonisinas por el pollo de engorda ocasionará mayores alteraciones morfológicas, aún en concentraciones de fumonisina no consideradas tóxicas.

7. OBJETIVO.

Evaluar la morfología macroscópica y microscópica de hígado, riñón, bazo y bolsa cloacal, ocasionado por el consumo de aflatoxina y fumonisinas.

8. MATERIAL Y METODOS.

El trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Granos y Semillas (UNIGRAS) ubicado en la Av. Dr. Jorge Jiménez Cantú s/n, Col. Atlamica, Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, así como en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, laboratorio 14 “Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis” y en cuarto experimental ubicado en la sala de necropsias de Patología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM, campo 4. Se utilizaron 144 pollos de un día de edad, 12 jaulas, alimentación ad libitum.

Dieta basal.

Se utilizó una dieta para pollos de engorda a base de maíz y soya: (NRC, 2001):

- materia seca 88.63%
- proteína 20 %
- grasa 10.53%
- fibra 2.8%.

También se analizó el contenido de aflatoxina, y fumonisina a través del método de columnas de inmunoafinidad según el protocolo descrito por la Asociación Oficial de Análisis Químicos (AOAC, 2000).

Producción de aflatoxina.

Para la producción de aflatoxinas (AFB) se inocularon a 24 kilos de maíz quebrado (previamente esterilizado), con una cepa toxigénica de *Aspergillus flavus* obtenida de UNIGRAS, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. Se agregaron 500 ml de agua destilada estéril y un inóculo de 10 ml el cual contenía 9 000 000 esporas por mililitro, por cada 4 kg de maíz molido. Posteriormente fueron incubados a 27°C y una humedad del 18% por un periodo de 30 días. Al cabo de los 30 días de incubación se analizó la cantidad de aflatoxina producida, utilizando columnas de inmunoafinidad (aflatest) elaborada por VICAM (NOM - 188 – SSA productos y servicios. Control de aflatoxinas cereales para consumo humano y animal), para posteriormente ajustar la dieta experimental a una concentración de 1000 Kg de AFB/kg de alimento.

Producción de fumonisina.

La cepa de *Fusarium moniliforme* (L-189-2) productora de fumonisina B1 y B2 (FB), se obtuvo a través de donación del Dr. Javier Plasencia de la Parra, del la Facultad de Química, departamento de Bioquímica de la UNAM. El hongo se inoculó en 24 kg de maíz molido (previamente esterilizado) y se incubó a 25°C a una humedad de 42%, por un período de 45 días. El análisis de fumonisina se hizo con la técnica de columnas de inmunoafinidad (fumonitest) similar a lo descrito para aflatoxinas (AOAC, 2000).

9. DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se utilizaron 144 pollos de engorda de la estirpe Ross, de un día de edad sin sexar, los cuales fueron distribuidos al azar en 4 tratamientos, cada uno con tres repeticiones de 12 pollitos cada una. Este procedimiento se calculó en base al programa Stargraphic plus versión 5 el cual determinó las muestras mínimas requeridas para tener valores significativos.

Los tratamientos quedaron conformados de la forma siguiente:

Testigo (T):	Libre de toxinas
Aflatoxina (AFB):	1 mg de FB1/kg de alimento.
Fumonisina (FB):	3 mg AFB1/kg de alimento.
Aflatoxina y Fumonisina (AFB+FB):	3 mg FB1/kg de alimento + 1 mg AFB1/kg de alimento.

A las aves se les proporcionó alimento y agua *ad libitum* por un período de 28 días. A los 7 días de edad las aves fueron vacunadas contra la enfermedad de Newcastle. La última semana del trabajo experimental (del día 21 al 28 de edad) se suspendió el alimento con micotoxinas de todas las aves con la finalidad de evaluar el efecto residual de las micotoxinas.

Los días 21 y 28 de haber iniciado el consumo de alimento contaminado, de cada tratamiento se seleccionaron 15 aves aleatoriamente que fueron sacrificadas por dislocamiento cervical y desangrados. Se realizó la necropsia para el registro de lesiones y peso de órganos (bazo, riñón, hígado y bolsa de Fabricio). Durante la necropsia se tomaron muestras de tejido de hígado, bazo, riñón y bolsa de Fabricio o bolsa cloacal para ser fijados en formalina al 4%, consecutivamente fueron procesados para realizar cortes histológicos y teñidos con la tinción de hematoxilina eosina (HE), para su posterior evaluación histológica.

Análisis estadístico.

Las variables de peso fueron analizadas con un ANOVA de una vía y la comparación de medias se hizo con el método de TUKY, respecto a las alteraciones morfológicas se utilizó estadística no paramétrica utilizando el método de Kruskal-Wallis. Los datos se analizaron utilizando el software estadístico Statgraphics 5.0 Plus con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

10. RESULTADOS.

Peso relativo de órganos.

Los órganos colectados para su análisis fueron: el bazo, la bolsa cloacal, el hígado y el riñón. La bolsa cloacal fue el único órgano que no mostró diferencia estadística ($P > 0.05$) entre los tratamientos, con un peso promedio de 0.269 g.

El bazo de las aves del grupo testigo mostró un peso mayor (0.092 g) frente a los demás grupos (0.074g AFB , 0.073g FB, 0.065g AFB+FB) ($P < 0.05$). No se encontró diferencia estadística al comparar los pesos promedio de los bazos de las aves del grupo AFB y el grupo AFB+FB pero tampoco el tratamiento FB.

El peso relativo de los hígados y los riñones al día 21 fue de 3.41 g y 1.16 g respectivamente en el grupo testigo. Sin embargo cuando es comparado con los pesos de las aves de los grupos experimentales se apreciaron cambios, siendo el peso promedio de los hígados y los riñones de 3.70 g y 1.043 g respectivamente del grupo AFB+FB y del grupo AFB los pesos promedio fueron 3.462g y 1.108g respectivamente (Cuadro 1).

PESO PROMEDIO RELATIVO DE DISTINTOS ÓRGANOS DE POLLOS ALIMENTADOS CON MICOTOXINAS								
21 días (peso en g)					28 días (peso en g)			
	BAZO	BF	HIGADO	RIÑÓN	BAZO	BF	HIGADO	RIÑÓN
Testigo	0.092 a	0.265 a	3.412 a	1.161 a	0.066 a	0.195 a	2.4 a	0.815 a
AFB	0.074 b	0.288 a	3.462 ab	1.108 ab	0.084 a	0.253 a	2.76 a	1.026 a
FB	0.073 b	0.286 a	3.317 ab	1.112 ab	0.09 a	0.283 a	2.86 a	0.977 a
AFB+FB	0.065 b	0.299 a	3.704 b	1.043 b	0.088 a	0.238 a	3.02 a	1.028 a

Cuadro 1. Pesos relativos de los órganos. Valores con diferentes literales en cada columna indican diferencia estadística ($P < 0.05$).

Hallazgos morfológicos (macroscópicos).

Tejido subcutáneo.

En el miembro pelvianos izquierdo en la piel y tejido subcutáneo a la altura de los músculos ileotibial lateral e ileotibial craneal se localizaron hemorragias petequiales y equimosis

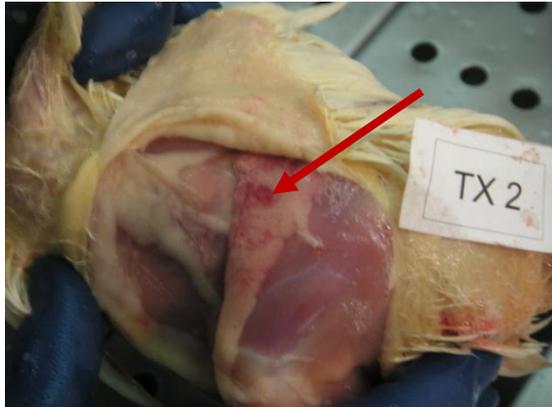


Foto 1. Petequias y equimosis músculos ilirotibiales. (flecha) en la parte craneal de los musculos “28 días de edad” tratamiento 3.

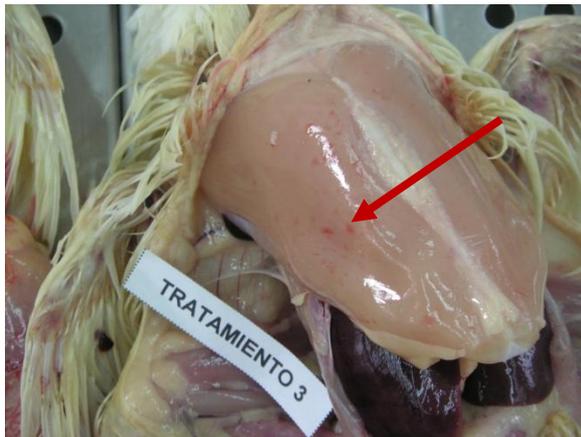


Foto 2. Petequias y equimosis (flecha) pectoral torácico. Lesiones en músculos pectorales “28 días de edad” tratamiento 3.

Sólo en un caso se observó presencia de exudado fibrinoso en cápsula del hígado correspondiente al tratamiento 3 a los 21 días de edad. Sin embargo esto se relacionó con la enfermedad de crónica respiratoria complicada y no por efecto directo de las micotoxinas presentes.

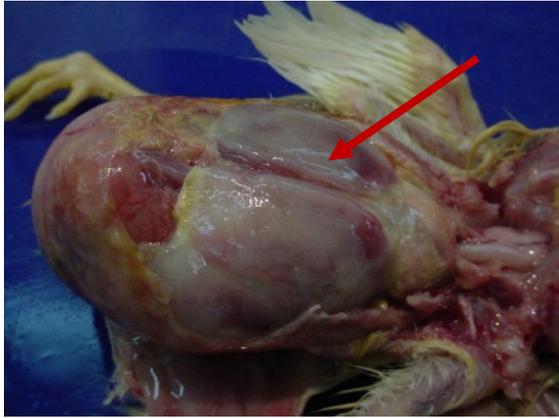


Foto 3. Exudado fibrinoso en hígado. (flecha) tratamiento 3.

Hígado.

Los hígados de las aves del grupo control no presentaron cambios patológicos aparentes (SCPA). Sin embargo los hígados de las aves de los grupos AFB Y FB (TX 1 y TX 2) mostraron aumento del volumen, bordes redondeados, así como cambios de coloración de café a café amarillento y consistencia que iba de suave y friable (Foto 4 hígados)

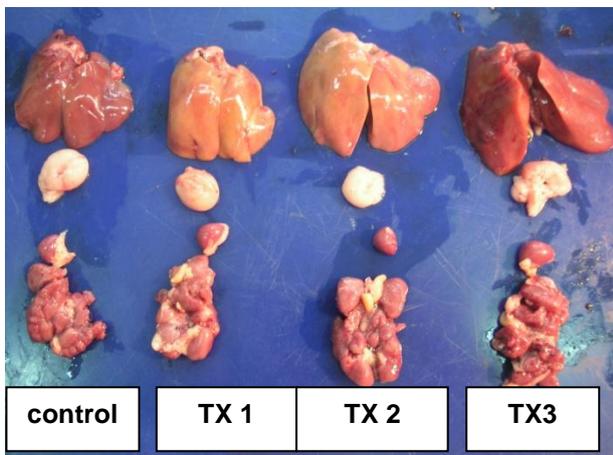


Foto 4. Hígados 21 días de edad.

Riñones.

Se observó nefrosis difusa moderada y acúmulos de uratos color blanquecino, principalmente en las aves del grupo AFB+FB.

		
Testigo	AFB	AFB+FB

Foto 5. Riñones

Respecto a los órganos como bazo, bolsa cloacal no se apreciaron cambios patológicos aparentes.

Hallazgos morfológicos (microscópicos).

Evaluación histológicas de las lesiones se realizó observando 10 campos con objetivo de 10x y 20x de 4 tejidos por cada tratamiento asignándose como valores 0 = sin cambios patológicos aparentes (SCPA); 1 = leve ; 2= Moderado; 3= severo

Los hepatocitos cercanos a la vena central se observaron aumentados de volumen, disminuyendo la luz de los sinusoides hepáticos, además de presentar vacuolas intracitoplasmáticas (hepatosis grasa) que desplazaron al núcleo a la periferia, sin embargo mostraron un núcleo activo (cromatina dispersa). En algunos casos se observó proliferación de tejido conectivo en espacio porta (fibrosis perilobulillar leve), con proliferación de conductos biliares de leve a moderado.

La alimentación con AFB en pollos demostró una hepatosis grasa difusa de moderado a severa. Esta degeneración fue encontrada en las áreas centrilobular. En casos severos, algunos hepatocitos tenían núcleos picnóticos (necrosis coagulativa) con reacción inflamatoria de leve a moderada.

La observación histológica del riñones mostraron aumento del volumen de las células que conforman el epitelio de los túbulos proximales y distales, con disminución de la luz (nefrosis difusa).

HISTOPATOLOGÍA

PROMEDIO DE LOS CAMBIOS HISTOLÓGICOS EN HÍGADO

21 DIAS

28 DIAS

	Deg Album	Deg Vac	HCB	HEB	Deg Album	Deg Vac	Fibrosis porta	HCB	Perdidad de arquitectura	HEB
Testigo	1	1	-	0.33	0.75	1	0.75	-	-	-
AFB	2	3	2.33	1.66	2	2.33	-	0.33	1.33	-
FB	2	1.91	-	0.83	1.6	1.4	-	0.7	1	1
AFB+FB	1.75	2.83	1.33	1.16	1.8	2	-	1.7	2	-

Cuadro 2. Resultados histopatológicos. Deg Album: degeneración albuminosa, Deg Vac: Degeneración Vacuolar, HCB: Hiperplasia de conducto biliar , HEB: hiperplasia de epitelio biliar.

11. DISCUSIÓN.

Las micotoxinas utilizadas afectaron la morfología de los órganos analizados, esto concuerda con lo reportado en la literatura en donde se mencionan un aumento del peso del hígado y riñones al estar presente la AFB (72), además se mencionan que la bolsa cloacal (BC) también se ve aumentada en su peso, sin embargo en este estudio no se observó dicho hallazgo. Kubena *et al.*, reportaron en 1997 que la fumonisina aumenta el peso de hígado y riñón, no así el de la BC, sin embargo utilizaron una concentración de 300 mg/kg de alimento muy superior a la utilizada en este trabajo que fue de 3 mg/kg y a pesar de la gran diferencia en la concentración utilizada, en este estudio si se apreció cambios en estos órganos.

Igualmente Kubena *et al.*, (1997), realizaron un estudio en donde utilizaron 0.075 mg de AFB /kg de alimento y 200 mg de FB/kg de alimento solas o en combinación en pollos de engorda, observando un efecto sinérgico a pesar de que la ingestión de una sola micotoxina también es capaz de afectar el peso de los órganos evaluados. Sin embargo en este estudio se observó el efecto individual únicamente de AFB en una concentración de 1ppm, no así para las fumonisinas a una concentración de 3 ppm.en combinación también se observó en este trabajo un efecto sinérgico lo cual concuerda con lo observado por este grupo de investigadores. Este mismo efecto fue descrito por Prathapkumar y Bhat, (1997) del efecto sinérgico que tienen la combinación de las dos toxinas afectando el peso de los órganos utilizando 0.07 a 8mg/kg de FB y de AFB 0.04 a 65 mg/kg. La explicación por el cual se vieron afectados estos órganos principalmente es que tanto la aflatoxina como la fumonisina interfieren con la síntesis proteica y metabolismo de los esfingolípidos respectivamente y el hígado es un órgano con mucha actividad, en el cuál se realiza síntesis proteica y lipídica. (Soriano *et al*, 2005)

Este trabajo demostró que la interacción y el consumo prolongado de FB1 y AFB1 pueden provocar lesiones relevantes en el hígado y riñón. Sería conveniente en investigaciones futuras la evaluación de enzimas celulares (AST, ALT, GGT) para realizar una valoración del daño celular y las vías metabólicas afectadas, como adyuvantes en la evaluación de grados de necrosis o apoptosis como en este estudio realizado.

12. CONCLUSIÓN.

En este estudio y bajo las condiciones llevadas de manejo y análisis se observó un efecto sinérgico con la presencia de AFB+FB a pesar de las concentración utilizadas especialmente para fumonisina, son consideradas bajas. La presencia de aflatoxina y fumonisina altera las características morfológicas de hígado y bolsa cloacal, más no así, de riñón y bazo.

13. LITERATURA CITADA.

1. Shlosberg A, Elkin N, Malkinson M, Orgad U, Hanji V, Bogin E. Severe hepatopathy in geese and broilers associated with ochratoxin in their feed. *Mycopathologia* 1997 ;(138):71-76.
2. Palmgren MS, Hayes AW. Aflatoxins in foods. In: *Mycotoxins in food*. Krogh P. editor. London: Academic Press; 1987:65-96.
3. Vasanthi S, Bhat RV. Mycotoxins in foods-occurrence, health & economic significance & food control measures. *Ind J Med Res* 1998 ;(108):212–224.
4. Curtui V, Usleber E, Dietrich R, Lepschy J, Martbauer E. A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia* 1998 ;(143):97-103.
5. Dennis P, Hsieh H. Proceedings of a Symposium. National Academy of Sciences, Washington, D.C., (1979) 43-55. [3] Espada y, Domingo M, Gómez J , Calvo MA. *Res Vet Sci* 53(1992)275-279.
6. Kubena LF, TS Edrington, RB Harvey, SA Buckley, TD Phillips, GE Rottinghaus and HH Caspers. Individual and Combined Effects of Fumonisin B1 Present in *Fusarium moniliforme* Culture Material and T-2 Toxin or Deoxynivalenol in Broilers Chicks. *Poult Sci* 1997; 76: 1239-1247.
7. Calnek, B. W. Título Enfermedades de las aves / B.W. Calnek con John Barnes; traducción Antonio Lemus Gamboa, Ana Felicitas Martinez Haro Pie de Imprenta Mexico : Manual Moderno, 2000.
8. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA). Centro de Estadística Agropecuaria. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de pollo en México en 2005.
9. Unión nacional de avicultores. www.una.org.mx.
10. D'Mello. J.P.F and Macdonald A.M.C. Mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 1997; 69: 155-166
11. Smith, J.E. and K. Ross. The toxigenic *Aspergilli*, in: Smith, J.E & Henderson, R.S. (eds) *Mycotoxins and Animal Foods*. Boca Raton, CRC Press 1991: 101 – 118.
12. Árpád. B and Radomir, L. Detoxification of mycotoxin-contaminated food and feed by microorganisms. *Food Science and Technology* 1999; 10: 223-228.

13. Osweiler, G.D; T.L. Carson; W.B. Buck and G.A. VanGelder. Clinical and Diagnostic. Vet. Toxic ed Kendall/Hunt, Iowa 1985
14. Chulze, S.N., M.L. Ramirez; M.C. Farnochi., M. Pascale and G. Visconti. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stage. J. Agric. Food Chem 1996; 44: 2797-2801.
15. Moreno, M. E. 1996. El maíz y las aflatoxinas en: La industria de la masa y la tortilla: desarrollo y tecnología. Torres, F., Chong, I y Quintanilla J. PUAL-UNAM. 139-145 p.
16. Moreno, M.E., and J. Ramírez, G. 1985. Protective effect of fungicides on corn seed stored with low and high moisture content. Seed Science and Technology 13: 285-290.
17. Cordle, F. and Kolbye, C. A. 1982. Environmental Contaminants in Foods. In: Nutritional Toxicology. Vol. I. Chap. 8. (Ed) Hathcock, N. J. Academic Press. N. Y. p. 308-311
18. Davis, W.D., Dickens, J.W., Freil, R.L., Hamilton, P.B., Shotwell, O.L., Wyllie, T.D., y Fulkerson, J.F. 1980. Protocols for surveys, sampling post-collection, handling and analysis of grain samples involved in mycotoxins problems. Journal of the Association of Official Analytical Chemists. 63: 95-102.
19. Sargent, K., A. Sheidan, J. O., Kelly, and R. B.A. Carnaghan. 1961. Toxicity Associated with certain samples of ground nuts . Nature 192:1096-1097.
20. Esqueda, V. M. y Villegas, O. R. M. 1991. Efecto de la producción de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* en maíz, sus métodos de degradación y su posible control con lectinas. Rev. Vinculación. 3(20): 44-47
21. Buchi, G. and Rae, I. D. 1969. The structure and chemistry of the aflatoxinas. In: Aflatoxins. Goldblatt, L. A., Ed., Academic Press, New York, p.55
22. Lillehoj, E. B. 1983. Effect of environmental and cultural factors on aflatoxin contamination of developing corn kernels. In *Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn*, Southern Cooperative Series Bulletin 279 for Southern Regional Project S-132; Diener, U. L., Asquith, R. L., Dickens, J. W., Eds, Auburn University: Opelika AL.
23. Asao, T., Buchi, G., Abbel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L. and Wogan, G.N. 1963. Aflatoxins B and G. J. Am. Chem. Soc. 87: 1076-1077.
24. Bullerman, L. B. 1987. Methods of detecting micotoxins in foods and beverages. In: Food and Beverage Micology. 2nd ed., Beuchat, L. R., Ed., AVI. New York, p. 571.
25. Jelinek, C. F., Pohland, A. E. and Wood, G. E. 1989. Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds: An update. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 223-230.

26. Townsend, C. A., Christensen, S. B. and Trauwein, K. 1984. Hexanoate as a starter unit in polyketide synthesis. *J. Amer. Chem. Soc.*, 106: 3868-3869.
27. Maggon, K. K., Gupta, S. K. and Venkitasubramanian, T. A. 1977. Biosynthesis of aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 41: 822-855.
28. Drew, S. W. and Demian, A. L. 1987. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31: 343-356.
29. Wicklow, D. T., Horn, B. W., Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W. and Caldwell, R. W. 1988. Fungal interference with *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination of maize grow in a controlled environment. *Phytopathol.*, 78:68.
30. Guthrie, L. D. 1979. Effects of aflatoxin in corn on production and reproduction in dairy cattle. *Journal Dairy Science* 62: 134-135.
31. Bodine, A. B., and D. R. Mertens. 1983. Toxicology, metabolism, and physiological effects of aflatoxin in the bovine. *In: Aflatoxin and Aspergillus flavus in corn.* Diener, U.L., R. L. Asquith, and J. W. Dickens (eds.). Alabama Agriculture Experimental
32. Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. and Cotty, P. J. 1994. Mycological aspects of aflatoxin formation. *In: The toxicology of aflatoxin formation. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.* Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.). Academic Press. N. Y. 327-346
33. Hayes, T. M. 1981. Mycotoxins and fetal development. Chap. 3. *In: Mycotoxins Teratogenicity and Mutagenicity.* CRS, Press, INC Boca Raton, Fl. p. 22- 39.
34. Nilipour, A. 1993. Micotoxinas. *Industria Avícola*, 10:10-11
35. Valladares, J. C. 1996. Micotoxicosis, su impacto en la industria pecuaria. *Nuestro Acontecer Avícola.* 4(20): 14-18.
36. Hornedo, A. S. 1989a. Efecto de las aflatoxinas en cerdos. *Síntesis Porcina.* 8(10): 21.
37. Valladares, J. C. 1996. Micotoxicosis, su impacto en la industria pecuaria. *Nuestro Acontecer Avícola.* 4(20): 14-18.
38. Bhatnagar, D., Cleveland, T. E. and Cotty, P. J. 1994. Mycological aspects of aflatoxin formation. *In: The toxicology of aflatoxin formation. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance.* Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.). Academic Press. N. Y. 327-346
39. Dvorackova, I. 1976. Aflatoxin inhalation and alveolar cell carcinoma. *British Medical Journal* 1: 691.

40. Krishna, S. B. and Sinha, K. K. 1991. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. In: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bathnagar, D., Lillehoj, E. B. and Arora, D. K. (Eds.). Marcel Dekker. N. Y. 59-85.
41. Peña, D. S. y Durán, M. C. 1990. Efecto tóxico de las aflatoxinas en la dieta. *Ciencia y Desarrollo*, 16(94):61-72.
42. Lillehoj, E. B. 1991. Aflatoxin: genetic mobilization agent. In: *Mycotoxins in Ecological Systems*. Bathnagar, D., Lillehoj, E. B. and Arora, D. K. (Eds.). Marcel Dekker. N. Y. 1-22.
43. Betina, V. 1989. Biological aspects of micotoxinas. Chap.3 *Chemical, Biological and Environmental Aspects*. Elsevier. N. Y., U.S.A. p. 42,50,52,101,433.
44. Shank, R. C. 1981. *Mycotoxins: Assesment of risk mycotoxins and N-nitroso compounds: Environmental Risk*. Volume I, R. C. Shank (Eds.). CRC Press, INC Boca Raton, Fl. p.141-154
45. Clifford, J. I. And Rees, K. R. 1966. Aflatoxin: a site of action in the rat liver cell. *Nature*, 209: 312-315.
46. Ellis, W. O., Smith, J. P. and Simpson, B. K. 1991. Aflatoxins in food: Occurrence, Biosynthesis, Effects on Organisms, Detection and Methods of Control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30 (3): 403-439.
47. Roebuck, B. D. and Maxuitenko, Y. Y. 1994. Biochemical mechanisms and biological implications of the toxicity of aflatoxins as related to aflatoxin carcinogenesis. Chap 2, en: *The toxicology of aflatoxins*, D. L. Eaton y J. D. Groopman (Eds). Academic Press, San Diego. p. 27-43
48. Eaton, D. L., Rammsdell, R. G., and Neal, G. E. 1994. Biotransformation of aflatoxins. In: *The toxicology of aflatoxins. Human Health, Veterinary and Agricultural Significance*. Eaton, D. L. and Groopman, J. D. (Eds.) Academic Press. N. Y. U. S. A. 45-71.
49. Dragan, Y. P. and Pilot, H. C. 1994. Aflatoxin carcinogens in the context of the multistage nature of cancer. Chap. 9. In: *The Toxicology of Aflatoxins*, D. L. Eaton and J. D. Groopman (Eds.). Academic Press INC. San Diego, CA. 179-206 p.
50. Hayes, T. M. 1981. Mycotoxins and fetal development. Chap. 3. In: *Mycotoxins Teratogenicity and Mutagenicity*. CRS, Press, INC Boca Raton, Fl. p. 22- 39.
51. Nilipour, A. 1993. *Micotoxinas*. *Industria Avícola*, 10:10-11

52. Gregory, F. J. and Manley, D. 1981. HPLC determination of aflatoxins in animal tissues and products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64(1): 144-151.
53. Fernández, A., Verde, M. T., Gascón, M., Ramos, J. J., Gómez, J. 1994. Aflatoxins and its metabolites in tissues from laying hens and broiler chickens fed a contaminated diet. *J. Food. Sci. Agric.* 65: 407-414.
54. Smith, J.E. and K. Ross. The toxigenic *Aspergilli*, in: Smith, J.E & Henderson, R.S. (eds) *Mycotoxins and Animal Foods*. Boca Raton, CRC Press 1991: 101 – 118.
55. Gordon S.S., W.F.O. Marasas., N.L. Leggott., H. Yazdanpanah., H. Rahimian and N. Safari. Natural occurrence of fumonisin in corn from Iran. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48: 1860-1864.
56. Medina-Martínez MS y Martínez AJ. Mold occurrence and aflatoxina B1 and fumonisin B1 determination in corn samples in Venezuela. *J. Agric. Chem* 2000; 48: 2833-2836.
57. Visconti A., W.F.O. Marasa., J.D. Millar and R. Riley. Tercera conferencia internacional mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. *Micotoxinas de interés creciente*. Túnez, Túnez. 3-6 marzo 1999.
58. Rosiles MR, Garcia MT y Ross FP. Confirmación fisicoquímica de la Fumonisina B1 en maíz y alimento para equinos que murieron por leucoencefalomalacia. *Vet Mex* 1996; 27: 111 – 113.
59. Placinta C.M., J.P.F. D’Mello and A.M.C. Macdonald. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology* 1999; 78: 21-37.
60. Ledoux D.R., A.j. Bermudez., K.L. Fritsche and G.E. Rottinghaus. Effects of fumonisin B1 on selected immune responses in broiler Chicks. *Poul. Sci* 1992; 78: 1275-1282.
61. Murphy PA, Rice LG, Ross PF. Fumonisin B1, B2 and B3 content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. *J Agric Food Chem* 1993; 41:263-266
62. Brown, T.P., G.E. Rottinghaus and M.E. Williams. Fumonisin Mycotoxicosis in broilers: performance and pathology. *Avian Dis* 1992; 36: 450: 454.
63. Bailly J.D., G. Benard., J.Y. Jouglar., S. Duran and P. Guerre. Toxicity of *Fusarium moniliforme* culture material containing known levels of fumonisin B1 in ducks. *Toxicology* 2001; 163: 11-22.
64. Betina VB. Bioactive secondary metabolite of microorganisms. *In Progress in Industrial Microbiology*. New York: Elsevier;1994.

65. Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxigenesis. *J Anim Sci* 1992;(70):3968-3988.
66. Christensen, C. M., Nelson, G.H., Mirocha, C.J. y Bates, F. 1968. Toxicity to experimental animals of 943 isolates of fungi. *Cancer Res.* 28: 2293-2295.
67. http://www.engormix.com/aditividad_sinergismo_antagonismo_entre_s_articulos_972_A_VG.htm
68. Soriano JM, L González and AI Catalá, 2005. Mechanisms of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Prog Lipid Res.* 44: 345-356
69. Prathapkumar H and RV Bhat. Natural Occurrence of Fumonisin B1 and its Co-occurrence with aflatoxin B1 in Indian Sorghum, Maize and Poultry Feeds. *J. Agric. Food Chem* 1997; 45: 2170 -2173.
70. Hornedo, A. S. 1989a. Efecto de las aflatoxinas en cerdos. *Síntesis Porcina.* 8(10): 21.
71. Micotoxinas de mayor impacto en la producción porcina e implicaciones para la salud pública A. Anadón, A. Céspedes, V. Caballero, M.R. MartínezLarrañaga and M.A. Martínez
Mycotoxins of major impact in pig production and human health implications Departamento de Toxicología y Farmacología, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 28040-Madrid E-mail: anadon@vet.ucm.es
72. Christensen, C. M., Nelson, G.H., Mirocha, C.J. y Bates, F. 1968. Toxicity to experimental animals of 943 isolates of fungi. *Cancer Res.* 28: 2293-2295.