

00361
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DE DESTOXIFICACION DE LA AFLATOXINA
B1 POR UN PROBIOTICO POR METODOS GENOTOXICOS
EN UN MODELO BIOLÓGICO EN RATON

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
M. en C. BIOLOGIA
PRESENTA

ROBERTO RAZO VASQUEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR DE TESIS: DR. EDUARDO MADRIGAL BUJAIAR

2002



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.

El presente trabajo se realizó en Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID-Microbiología) del INIFAP, con la colaboración del Laboratorio de Genética del Departamento de Morfología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. bajo la dirección del Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar y la codirección del Dr. René Neftalí Márquez Márquez.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

"AUNQUE EL CAMINO ESTE LLENO DE ESPINAS, PUEDE SER CAMINADO"

TLAZOHCAMATI HUEL MIAC

DEDICATORIAS

A Maria Cruz.

Por su apoyo en mi lucha por la vida y su comprensión en todos mis proyectos

A Nelly Gabriela

Por su sencillez y amor a la humanidad

A Roberto

Por su inquieta avidez por conocer, su carácter y sensibilidad hacia la vida

A Diego

Por representar una esperanza de vida

A Berta

Por su nobleza incondicional

A Guadalupe Vasquez de Razo

Por enseñarme que en la vida, la tenacidad es necesaria para salir adelante

A Doroteo Razo Gutierrez (†)

Por ser un ejemplo al trabajo y rectitud hacia los demas

A mis hermanos

Por compartir esfuerzos con sus hijos

A Francisca Toledo Luna

Por ser mi otra mamá, que me brindo la tranquilidad de su vida

A Gabino Razo Gutierrez (†)

Por haber sido mi otro papá, que cuidaba de mis inquietudes

AGRADECIMIENTOS

A mis sinodales.

M. en C. Ma de los Angeles Aguilar Santamaría

Dra. Regina Dorinda Montero Montoya

M. en C. Matilde Breña Valle

Dr. Eduardo Madrigal Bujaidar

Dr. René Neftalí Márquez Márquez

M. en C. René Rosiles Martínez

Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez

Quiero agradecerles de todo corazón, esos momentos de paciencia y comprensión que me brindaron al apoyarme en la redacción del presente trabajo. Gracias.

Al Dr. Eduardo Madrigal por la acertada dirección del presente trabajo.

Al Dr. René Márquez por la codirección del presente trabajo y su valiosa ayuda técnica y científica.

A esos seres, en quienes he experimentado para obtener el conocimiento esperado... PERDON.

A la U.N.A.M. y a la Facultad de Ciencias, por permitir superarme en beneficio de la sociedad

Al (CENID-Microbiología) del INIFAP. Por todos los apoyos recibidos al permitir la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	9
1. INTRODUCCIÓN	10
1. 1. Aflatoxinas	10
1. 2. Toxicidad	12
1.2.1. Aflatoxicosis aguda.....	13
1.2.2. Aflatoxicosis crónica	13
1.2.3. Toxicocinética.....	14
1.2.4. Absorción.....	14
1.2.5. Distribución.....	15
1. 3. Biotransformación	15
1.3.1. Fase I.....	15
1.3.2. Fase II.....	17
1. 4. Alteraciones metabólicas Ocasionadas por la AFB1	20
1. 5. Efectos del maíz contaminado con AFB1	21
1.5.1. Mutagenicidad.....	22
1. 6. Destoxificación de la aflatoxina	23
1. 7. Propuestas para el control de la contaminación por micotoxinas	25
1. 8. Mutagénesis	26
1.8.1. Agentes mutagénicos.....	26
1. 9. Carcinogénesis	27
1. 10. Antimutagénesis	28
1. 11. Probióticos	30
1.11.1. Propiedades ideales de un probiótico.....	31
1.11.2. Posibles mecanismos de acción de los probióticos.....	31
1. 12. Levaduras	34
1.12.1. Generalidades acerca de las levaduras.....	34
1.12.2. Características bioquímicas y microbiológicas de las levaduras.....	34
1.12.3. Cultivo de levaduras.....	35
1. 13. Características de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	36
1.13.1. Características de los glucanos y mananos.....	36

1. 14. Disminución de los efectos de AFB1 por la acción de <i>S. Cerevisiae</i>	38
1. 15. Pruebas de Genotoxicidad	39
2. JUSTIFICACIÓN	42
3.-OBJETIVO GENERAL	43
3. 1. Objetivos específicos	43
4. HIPÓTESIS	43
5. MATERIAL Y MÉTODOS	44
5. 1. Medidas de Seguridad	44
5. 2. Experimento in vitro	44
5.2.1. Cultivo de <i>Aspergillus parasiticus</i>	44
5.2.2. Producción de AFB1 en maíz.....	45
5.2.2.1. Purificación del extracto.....	45
5.2.2.2. Preparación del extracto de AFB1.....	46
5.2.2.3. Estudio cromatográfico del extracto.....	46
5. 2. 3. Pruebas de viabilidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	46
5. 2. 4. Contaminación del maíz en diferentes concentraciones.....	47
5. 2. 5. Determinación de cambios estructurales de la molécula de AFB1.....	48
5. 3. Experimento in vivo	50
5. 3. 1. Preparación de las dietas.....	50
5. 3. 2. Lotes de animales para el experimento in vivo.....	52
5. 3. 3. Determinación de ganancia de peso.....	53
5. 3. 4. Análisis de micronúcleos.....	53
5. 3. 5. Estimación de la frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas ICH.....	54
6. RESULTADOS	57
6. 1. Pruebas in vitro	57
6. 1. 1. Cuantificación de la AFB1.....	57
6. 1. 2. Capacidad de Adsorción de AFB1 por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
6. 1. 3. Efecto de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> sobre la estructura química de la AFB1.....	63
6. 2. Pruebas in vivo	67
6. 2. 1. Ganancia de peso en ratones CD-1.....	67
6. 2. 2. Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas.....	71

6. 2. 3. Eritrocitos normocrómicos micronucleados.....	74
7. DISCUSIÓN	77
8. CONCLUSIONES	87
9. BIBLIOGRAFIA	89

RESUMEN

La AFB1 constituye un problema de salud pública, por ser un compuesto toxicológico y toxigénico que se encuentra en productos agrícolas que se emplean como fuente alimenticia para animales y humanos. Considerando lo anterior, se desarrolló el presente trabajo, con el objeto de establecer la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* (S c) de reducir la toxicidad y genotoxicidad de maíz contaminado con AFB1 en ratón por pruebas genotóxicas. Se determinó en un ensayo *in vitro* el efecto de *S. Cerevisiae* sobre la cantidad de AFB1. Los resultados indicaron que en efecto, *S. Cerevisiae* adsorbe a la aflatoxina, pero no modifica su estructura. En un ensayo *in vivo* se determinó la toxicidad y genotoxicidad de la AFB1 al evaluar ganancia de peso, frecuencia de intercambios de cromátides hermanas en médula ósea y frecuencia de micronúcleos en eritrocitos normocromáticos en sangre periférica, incluyendo en el estudio un testigo. Los resultados indicaron que el probiótico redujo la toxicidad del maíz contaminado al presentarse una ganancia de peso significativa en los ratones tratados con AFB1 y 0.3 % de levadura. En cuanto a las ICH, los ratones sin aflatoxina presentaron un promedio de 3.3 ICH, notándose un incremento al aumentar la dosis de AFB1 sin probiótico. Respecto a los micronúcleos, se encontró un promedio de 2MN/1000 E N en ratones sin FB1 y un incremento en los ratones alimentados con AFB1 sin probiótico. El presente trabajo concluye que la genotoxicidad en ratones alimentados con maíz contaminado con AFB1 depende de la dosis y del tiempo de exposición y que este efecto se reduce hasta 40 % con la adición de 0.3 % de *S. Cerevisiae*.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1. Aflatoxinas

Características y Estructura

Las aflatoxinas pertenecen a un grupo de metabolitos heterocíclicos sintetizados por hongos del género *Aspergillus flavus* (Link) y *A parasiticus* (Speare). Las aflatoxinas se han descrito desde 1960 y de acuerdo con el color de la fluorescencia que presentan al exponerse a la luz ultravioleta, se les nombra B ("blue"), si producen una coloración azul y G ("green"), si su coloración es verde; químicamente se clasifican como difuranocumarinas (Buchi y Rae, 1969). No todas las cepas de *Aspergillus* son aflatoxigénicas, ya que la biosíntesis de aflatoxinas está supeditada a varios factores biológicos y fisicoquímicos en el medio en que se desarrollan la especie que las producen (Bayman y Cotty, 1993; Takahashi, 1993).

En particular la toxicidad de las aflatoxinas depende de su estructura y de la capacidad de ser activado metabólicamente en compuesto electrofilo (Rodricks y cols 1977). Es importante mencionar que la susceptibilidad al efecto tóxico en los animales incluyendo al humano depende de algunos factores como: especie, edad, sexo, estado fisiológico y nutricional (Pier, A. C., 1987; Adams, S. P. y cols 1996).

La estructura de la aflatoxina B1 está formada por un anillo bifurano fusionado a un núcleo cumarina unido a un anillo penténico.(figura 1) (Sakai y cols.1992; Lesson y cols,1995)

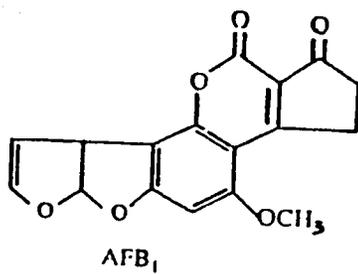


Figura 1. Estructura de la aflatoxina B1.

1. 2. Toxicidad

La toxicidad de las aflatoxinas depende de la naturaleza química del sustituyente y del sitio estereoquímico en que se encuentre éste dentro del anillo de bifuranocumarina, así como de la capacidad metabólica que lo lleve hasta la formación de un producto altamente electrofilo (Rodricks y cols., 1977; Lafont y cols., 1989). Ensayos *in vitro* que incluían enzimas de la fracción del citocromo P 450 determinaron que la AFB1 es la que presenta mayor toxicidad. A partir de esto se le considera el compuesto natural con mayor capacidad citotóxica, mutagénica y hepatocarcinogénica que se conoce, ya que produce necrosis aguda, cirrosis y carcinoma hepático en una gran variedad de especies animales, incluyendo al hombre (Pier, 1987; Adams y cols., 1996).

La toxicidad de AFB1 se hace evidente primordialmente en los hepatocitos, debido a su contenido de enzimas del citocromo P 450, en comparación con otras células. La exposición continua a la toxina, se considera uno de los factores implicados en los carcinomas hepatocelulares. (Chen y cols., 1992).

Iwaki y colaboradores en 1990 trabajando con cultivos celulares primarios mostraron que las aflatoxinas interactúan con el ADN, ARN y proteínas intracelulares de hepatocitos tanto humanos como de pollos, con la consecuente reducción de la síntesis proteica. Kichou y Wasler en 1994, mostraron en experimentos *in vitro* en condrocitos de pollo, que la AFB inhibe la síntesis de ADN.

Otros investigadores han evaluado la toxicidad de la aflatoxina sobre la síntesis de ADN en diferentes líneas celulares, así como en cultivos de hepatocitos de varias especies, incluyendo al hombre (Tsen, y cols, 1992; Lake, y cols, 1996).

La DL₅₀ de las aflatoxinas es de 1-50 µg/kg para la mayoría de las especies animales. En general, la toxicidad de la AFB1 depende de la dosis y del tiempo de exposición, a partir de lo cual se han identificado dos tipos de aflatoxicosis denominadas aguda y crónica (Smith y Ross. 1991)

1. 2. 1. Aflatoxicosis aguda

La intoxicación aguda es ocasionada por la ingesta abundante de aflatoxina, que produce una enfermedad que clínicamente se caracteriza porque el paciente presenta depresión, anorexia, ictericia y hemorragia, las lesiones histopatológicas incluyen necrosis periportal, y proliferación de ductos biliares (Osweiller, 1985).

1. 2. 2 Aflatoxicosis crónica

La aflatoxicosis crónica se presenta debido a la ingestión continua de AFB1 durante tiempos prolongados y se caracteriza por disminución en la ganancia de peso, y el consumo de alimento, así como una deficiente conversión de alimento en ganado bovino, cerdos y aves, además de presentar, disminución de órganos linfoides Otros investigadores determinaron que en la aflatoxicosis crónica hay inhibición de la síntesis plasmática, reflejada como hipoalbuminemia y baja de las globulinas α y β , así como en los factores de coagulación, V, VII y en el fibrinógeno (Huff y cols, 1983; Pier, 1992; Jassar y Singh, 1993).

No se le ha dado suficiente importancia toxicológica al bajo contenido de aflatoxinas cuando el paciente las consume por tiempo prolongado, sin embargo en ciertos casos se deben tener presente sus posibles efectos mutagénicos y hepatocarcinogénicos, ya que parte de la toxina activada permanece en el tejido y puede causar daño en el ADN y ARN a través de la formación de aductos, produciendo mutaciones que pueden continuar con un proceso carcinogénico.

En ciertos casos de cáncer hepático se ha reportado la relación entre éste y la hepatitis B de personas cuyas dietas contenían aflatoxinas (Carbajal, 1997; Smela y cols. 2001).

1. 2. 3. Toxicocinética

Las aflatoxinas son eliminadas de la circulación sistémica por biotransformación, excreción y almacenamiento en diversos sitios del organismo; la contribución relativa de estos procesos a la eliminación depende de las propiedades físicas y químicas de la aflatoxina (Albert L. A. 1997).

1. 2. 4. Absorción

La absorción de las aflatoxinas se presenta al momento en que cruzan las membranas celulares y entran al torrente sanguíneo. La velocidad de absorción a través de la membrana depende de la liposolubilidad, y el tamaño molecular. Las aflatoxinas son de bajo peso molecular (312.06 daltones), y fácilmente absorbidas hacia el flujo sanguíneo, y sus principales sitios de absorción son la piel, el hígado, los pulmones y el tracto gastrointestinal (Obioha y col., 1986; Klaassen y cols, 1991).

1. 2. 5. Distribución

Las aflatoxinas se acumulan principalmente en los órganos biotransformadores como hígado y riñón, aunque no sólo se limita a estos órganos. Al administrar AFB1 marcada con ¹⁴C a gallinas, se observó mayor concentración en hígado, músculo, páncreas, piel, pulmones, bazo y tejido adiposo. En otro estudio similar en pollos, la más importante acumulación fue en hígado, riñón y médula ósea, mientras que los niveles más bajos se localizaron en cerebro y tejido adiposo (Herland y Cardeihac, 1975).

1. 3. Biotransformación

Se llama biotransformación al conjunto de procesos bioquímicos mediante los cuales los organismos modifican las sustancias químicas para facilitar su excreción (Albert . L. A. 1997). La biotransformación de la AFB1 se inicia por la enzima oxidasa contenida en los microsomas hepáticos, y el proceso se divide en dos fases: (Figura 2)

1. 3. 1 Fase I

En esta fase las aflatoxinas pueden sufrir reacciones de oxidación, reducción o hidrólisis, por acción de las enzimas del citocromo P 450 que las transforma a metabolitos hidrosolubles como AFM1, AFQ1, AFP1, AFB2a y aflatoxicol. Las enzimas del citocromo P-450 se encuentran en tejidos con células ricas en retículo endoplasmático liso (hígado, riñón, intestino y pulmones) y participan en las reacciones de hidroxilación, o-desmetilación y epoxidación.

Durante la fase I la AFB1 es activada metabólicamente por la oxidasa de los microsomas hepáticos, por lo que aquellos factores que puedan activar o inhibir dicha función, también influirán en la toxicidad de esta micotoxina (Eaton y Gallagher, 1994)

Hidroxilación

Las enzimas del citocromo P-450 transforman por hidrólisis a la AFB1 en AFM1 (Chen y cols.,1984). En cambio, la acción conjunta del citocromo P-488 y P-450 en la AFB1, da origen a la AFQ1 detectada como un metabolito menor (Hsieh y cols., 1977; Yoshikawa y cols., 1982). La AFB1 se puede hidroxilar en el doble enlace vinil-éter (C8-C9) formando el derivado 8-hidroxilado conocido también como AFB2a, en este caso la AFB1 es metabolizada de 5 a 10 % al hemiacetal AFB2a por pollos, ratones y cobayos (Roberts,1970)

O desmetilación

La acción de la o-desmetilasa (enzima encontrada en hígado de ratón, mono y rata) transforma a la AFB1 en un producto fenólico llamado AFP1

Reducción

Por otra parte el grupo carbonilo C1 se puede reducir a un grupo hidroxilo, formando el aflatoxicol respectivo, proceso metabólico que no depende del citocromo P-450, sino de la enzima reductasa citoplasmática dependiente de NADPH.(Patterson y Roberts 1970). Al aflatoxicol se le considera como una forma de almacenamiento de la AFB1 debido a que por acción de una deshidrogenasa microsómica vuelve a oxidarse a AFB1 (Hsieh y cols., 1977).

Epoxidación

La epoxidación de la AFB1 es realizada por la oxidasa del citocromo P-450, transformando a la AFB1 en el epóxido 8-9 de aflatoxina estructura de gran reactividad en los sitios nucleófilos de macromoléculas celulares, como ácidos nucleicos y enzimas (Wilson y cols., 1995). Con los ácidos nucleicos interactúa en dos formas: una, por medio de un enlace débil no covalente y reversible, y otra con enlace covalente e irreversible, con la formación de aductos AFB1-ADN (Kiesling, 1986). Estos aductos se forman al unirse la AFB1 activada (8-9 epóxido) a las fracciones de guanina del ADN, formando guanina-N7-AFB1, [8,9-dehidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxi-aflatoxina B1], que constituye el principal aducto (80%). La estereoespecificidad que presenta el 8-9 epóxido de AFB1 con el ADN origina que el sitio de unión covalente sea en la posición N7 de la guanina (Raney y cols., 1990, Columbe, 1993). Esta constituye la lesión bioquímica primaria responsable de la mutagenicidad y carcinogenicidad de la AFB1. La presencia de aductos en el ADN altera el molde durante el proceso de transcripción e inhibe a la polimerasa de ARN lo que interfiere con la transcripción (Hsieh, 1979b; Choy, 1993)

1. 3. 2. Fase II

Durante la fase II, los productos de la fase I se pueden conjugar con otros compuestos como: ácido glucorónico, grupos acetilo o metilos, glutation, sulfatos y aminoácidos, para así incrementar su hidrosolubilidad y a la vez facilitar su eliminación a través de la orina, bilis, leche o albúmina de huevo según la especie animal de que se trate.

Conjugación

Las reacciones de conjugación de las micotoxinas son irreversibles, y se efectúan en el citoplasma celular de ciertos órganos biotransformadores. Así la AFM1 y la AFP1 se eliminan como conjugados taurocólicos y glucurónicos (Eaton y Gallagher, 1994). En 1974 Chipley y colaboradores observaron en pollos alimentados con dietas que contenían AFB1 marcada con ^{14}C , que el principal metabolito conjugado con péptidos o aminoácidos era AFB2a y en menor concentración, el glucoronato de AFM1. Dalezios y colaboradores en 1973 detectaron en monos los conjugados con sulfatos y ácido glucurónico de varias aflatoxinas.

Se ha demostrado que la destoxificación del 8,9 epóxido se realiza por acción de la GSH-transferasa (glutathion transferasa) eliminándose después en la orina (Columbe, 1993). Esto a su vez impide la unión hacia los sitios nucleofílicos de las macromoléculas, constituyendo un importante mecanismo de eliminación en los ratones (Eaton y Gallagher. 1994)

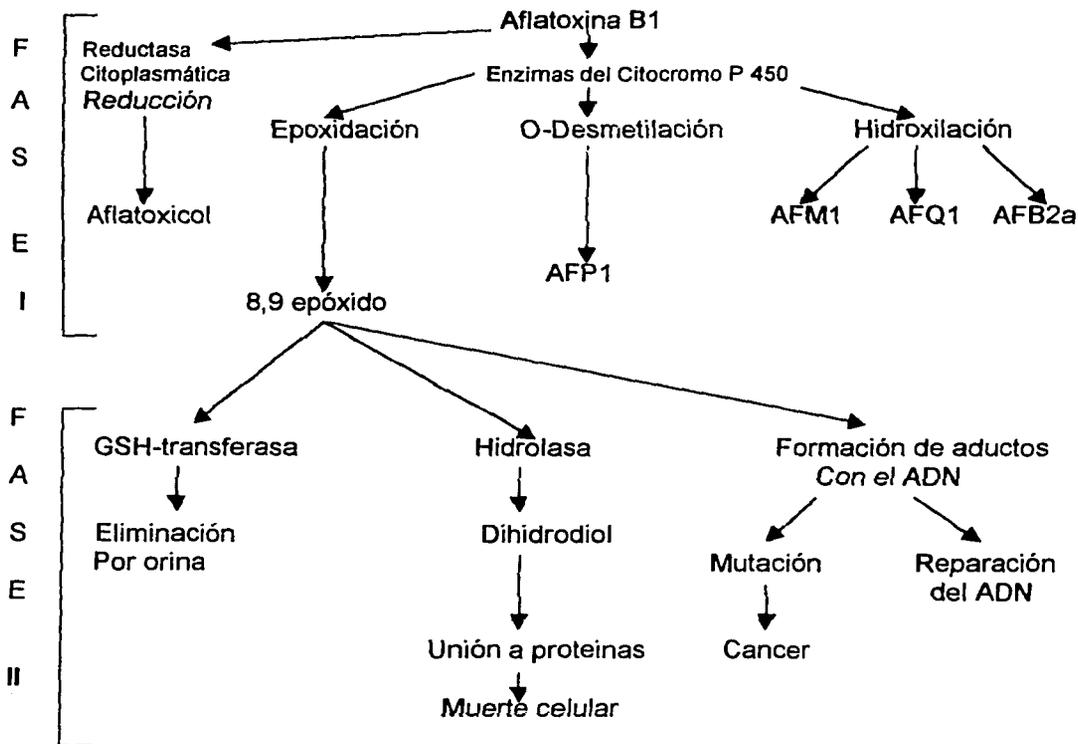


Figura 2. Vía de biotransformación de la AFB1

1. 4. Alteraciones Metabólicas Ocasionadas por la AFB1

Al unirse la aflatoxina B1 covalentemente con proteínas funcionales se produce una disminución de la actividad enzimática, por ejemplo, en el metabolismo de carbohidratos la glucogenogénesis se disminuye al inhibirse la UDP-glucosa-glucogenotransglucosilasa, glucogen-fosforilasa, fosfoglucomutasa y la glucosa 6 fosfatasa; La aflatoxina induce la depresión del glucógeno hepático al fallar la síntesis enzimática (Hsieh, D.P, 1979a). En este caso la AFB1 inhibe a la succinico-deshidrogenasa, la adenosin-trifosfatasa y el flujo de electrones entre el citocromo b y el c, durante el ciclo de Krebs, disminuyéndose así la cantidad de sustratos para efectuar los pasos consecutivos. Al inhibir enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos y del colesterol, durante el metabolismo de lípidos, se presenta una acumulación de lípidos en los hepatocitos. Merkle y colaboradores en 1987 determinaron experimentalmente que los niveles plasmáticos del perfil de lípidos se elevaron al aumentar la concentración de AFB1 a las dietas de pollos.

Tung y colaboradores en 1975, y Lanza y colaboradores en 1980 observaron una disminución en la hemoglobina y el hematocrito en aves alimentadas con dietas contaminadas con AFB1. La aflatoxina B1 altera el proceso de transcripción del ADN, al unirse al epóxido covalentemente con los ácidos nucleicos del ADN e inhibiendo la ARN-polimerasa.

1. 5. Efectos del maíz contaminado con AFB1

La información disponible en los ámbitos nacional e internacional muestra que existen altos niveles de aflatoxinas en una gran variedad de alimentos, tanto para seres humanos como para animales, lo cual se considera un elevado riesgo para la salud humana (Guarino,1983; Torreblanca y cols., 1987; Macoco, 1994; Hyginio, 1997; INIFAP, 1997).

Al haber condiciones adecuadas, de humedad, oxigenación y temperatura para el crecimiento de los hongos, éstos contaminan fácilmente ciertos productos como cacahuate, soya, maíz, arroz, sorgo, centeno, frutos, trigo, nueces y cacao. Los factores que facilitan la presencia de hongos productores de micotoxinas durante el almacenamiento de productos agrícolas son: la humedad relativa de 80-85 % y la total de 17 %, así como temperaturas de 24-35 °C, y alta concentración de carbohidratos (Lopez y Christensen 1967). Conociendo estos factores se ha intentado evitarlos mediante el uso de antifúngicos en silos de almacenamiento. Inicialmente las especies de hongos productoras de aflatoxinas se consideraban hongos de almacén, pero posteriormente se identificaron como contaminantes en las plantas y frutos. Además se determinó que su desarrollo y contaminación eran favorecidos por los mismos factores del almacenamiento así como por condiciones extremas de humedad y temperatura, que a su vez influyen en las especies que interactúan (insectos , microorganismos, y el huésped), lo que afecta la integridad del producto en desarrollo, y aumentaba el ataque fúngico (Moreno, 1983; Lillehøj, 1986).

Se han encontrado datos alarmantes respecto al contenido de aflatoxinas en maíz, y en sus productos terminados. Macoco (1994) reporta que cerca de 40 % de muestras presentaban niveles superiores a 50 µg/kg de AFB1, en tanto que los valores permitidos por la OMS son de 20 µg/kg de aflatoxinas totales (Davis, y cols 1980).

Torreblanca y colaboradores (1987) encontraron que más de 60 % del maíz nixtamalizado proveniente del D.F. y de los otros estados del norte de México rebasaba dichos valores permisibles, demostrándose que ni la aplicación de altas temperaturas o la elevada alcalinidad eran suficientes para la destoxicación

1. 5.1. Mutagenicidad de la aflatoxina

La aflatoxicosis en humanos adquirió mayor interés a partir de la información reportada por Harland y Cardeilhac en 1975, sobre la absorción de las aflatoxinas en el tracto gastrointestinal y su infiltración a los tejidos blandos, pero sobre todo acerca de la biotransformación en hígado y riñón, lo que los llevó a relacionarla con el daño hepático encontrado en humanos con antecedentes de intoxicación con micotoxinas. Carbajal, (1992), presentó un panorama del desarrollo y daño que ocasionan las aflatoxinas, las cuales se consideran el más potente carcinógeno biológico conocido.

1. 6. Destoxificación de la aflatoxina

La contaminación de los productos alimenticios por aflatoxinas motivó a muchos investigadores a desarrollar y aplicar métodos para tratar de prevenir y contrarrestar la contaminación por dichas sustancias. Dichas metodologías incluyen desde la vigilancia de prácticas agrícolas correctas hasta la terminación del producto, revisando el grado de micotoxinas permisibles (Truckess M., 1977; Rojas y cols., 1992; Peña y cols., 1992). Cualquiera de los métodos recomendados debe ser económico, y capaz de eliminar todos los vestigios de micotoxinas sin dejar residuos, no afectar los nutrientes de los productos que se van a destoxificar. Tales métodos pueden ser físicos, químicos o biológicos (Ellis y cols., 1991; Robb, 1993).

Inactivación por calor

Debido a su estructura química, las aflatoxinas presentan una termoestabilidad mayor a 260 °C, por lo que los métodos de ebullición, presión de vapor, tostado y horneado no reúnen las características necesarias para eliminarlas (Park, 1993).

Irradiación

La irradiación con luz ultravioleta aplicada durante 14 h reduce los niveles de AFB1 en cacahuates hasta en 50 % (Park, 1993). La radiación gamma destruye las aflatoxinas de alimentos contaminados de manera eficaz bajo condiciones de alta humedad y niveles superiores a 2 Mrads, pero esta radiación no está permitida en las normas internacionales para productos comestibles (Márquez y cols, 1995).

Adsorbentes

La biodisponibilidad de las aflatoxinas puede reducirse utilizando aluminosilicatos de sodio y calcio, así como de zeolitas y bentonitas que eliminan a las aflatoxinas de suspensiones acuosas al unirse a ellas físicamente evitando así la absorción intestinal (Kubena y cols, 1989; Harvey y cols, 1991; Linderman y cols, 1993; Marquez y cols, 1995).

Inactivación química

Se han usado diferentes compuestos para inactivar a las aflatoxinas, entre los cuales se tienen a los siguientes: metilamina, bisulfito de sodio, hipoclorito de sodio entre otros, eliminando altos porcentajes de AFB1 (Goñi y Tejada, 1987). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante elimina 97 % de AFB1. El empleo de hidróxido de amonio al 1.5 % en maíz contaminado produjo una inactivación mayor a 85 % (Marquez y cols 1995). No obstante la inactivación química deja residuos en productos descontaminados, provocando cambios de sabor, aspecto o color, lo cual a su vez disminuye su aceptabilidad (Ellis y cols 1991).

Inactivación con solventes orgánicos

Park y Liang (1993) propusieron utilizar el cloruro de metileno para la extracción de aflatoxinas, simultáneamente con aceite de la semilla de algodón, reduciéndose la aflatoxina de 73 a 92 %, y eliminándose el resto con soluciones alcalinas mediante el proceso de refinación. Sin embargo, el tratamiento no es selectivo y se extraen y eliminan vitaminas no hidrosolubles (Leeson, y cols 1995).

Inactivación biológica

El empleo de *S. cerevisiae* disminuye la aflatoxicosis en pollos y patos, dando resultados alentadores para continuar con su aplicación (Stanley y cols, 1993; Devegowda y cols, 1995).

1. 7. Propuestas para el control de la contaminación por micotoxinas

Las altas concentraciones de micotoxinas encontradas en los alimentos para humanos y animales, motivaron la puesta en marcha, en más de 80 países, de una serie de estrategias que normen y garanticen la disminución de las micotoxinas en los alimentos. Las actividades propuestas para su control son: 1) Control fitosanitario en todas las etapas de la producción agrícola. 2) Control sanitario en la elaboración de alimentos (análisis de alimentos). 3) Normatividad de los niveles permisibles de micotoxinas en los productos que regulen su comercialización. 4) Establecimiento de métodos de prevención y descontaminación de productos destinados a la alimentación. 5) Aplicación de otras actividades en el campo como: a) desarrollo biotecnológico para la obtención de especies resistentes a hongos. b) aplicación de técnicas que permitan reducir la temperatura y humedad durante el almacenaje y transportación de granos y control biológico para eliminar las plagas que propicien el daño fúngico (INIFAP, 1997; Truckess, 1977; Robb, 1993).

Hasta la fecha, estos propósitos no han sido satisfactorios, ya que todavía se encuentran altos niveles de micotoxinas en productos agrícolas a lo largo de las diferentes etapas de producción lo cual es preocupante, ya que se consumen productos (tortillas, cereales, harinas, palanquetas, carnes de pollo y cerdo, embutidos, huevo, leche y queso) con alto contenido de aflatoxinas, y otros contaminantes de origen fúngico (Márquez y cols, 1994; Carbajal, 1992; Rosiles, 1997; Torreblanca y col, 1987; Macoco, 1994).

1. 8. Mutagénesis

A pesar de que la información genética se trasmite de generación en generación con gran fidelidad, asegurando que las características de las especies se mantengan, en ocasiones se presentan cambios en la secuencia del ADN o ARN a los que se denominan mutaciones (Rigger, 1991). Dichas mutaciones se pueden clasificar en mutaciones génicas o microlesiones y en cambios estructurales o numéricos en los cromosomas. Los cambios en el número cromosómico, se dan por la no separación de los cromosomas (no disyunción) o un rezago anafásico. (Salamanca, 1993; Guizar J, 1994).

1. 8. 1. Agentes mutagénicos

Se les ha dado el nombre de agentes mutagénicos a todas las sustancias o factores físicos que ocasionan los cambios antes mencionados y que pueden ser heredados (Salamanca, 1993).

Agentes químicos

Los mutágenos químicos se clasifican en dos clases de acuerdo con su acción. De acción directa, cuando el mutágeno no requiere transformación química para tener efecto ya que reaccionan directamente con el ADN, en cualquier etapa del ciclo celular. La hidroxilamina, el ácido nitroso y diversos agentes alquilantes como la mostaza nitrogenada son ejemplo de esta clase de mutágenos. De acción indirecta son los mutágenos que requieren conversión metabólica *in vivo* para generar intermediarios finales capaces de reaccionar con el ADN. Estos productos son electrófilos muy reactivos. y en las células pueden atacar puntos ricos en electrones incluyendo el ADN, el ARN y las proteínas.(IARC, 1979; Pereira, 1982; Wigley, C., y Balmain, A. 1991).

Agentes físicos

La radiación gamma, los rayos X, los rayos cósmicos y la radiación ultravioleta constituyen algunos mutágenos físicos. La dimerización de dos timinas adyacentes en el mismo filamento de ADN, provocada por la luz ultravioleta bloquea la duplicación normal del ADN, ya que la cadena muestra espacios vacíos en lugar de la base correspondiente (adenina) al no poder replicarse normalmente.

1. 9. Carcinogénesis

El cáncer constituye una de las enfermedades más frecuentes y graves de nuestros días y se ha encontrado que alguna forma de esta enfermedad afecta a una tercera parte de la población, causando más del 20 % del total las muertes.

Se le da el nombre de cáncer a la proliferación celular con un crecimiento descontrolado.(Thompson y McInnes. 1996) Debemos tener presente que en un gran número de tipos de cáncer, no sólo interviene la interacción ambiental y la respuesta genética, sino también la predisposición del individuo para contraerlo, lo que aumenta la complejidad de la enfermedad (Robbins y cols., 1995). Se ha visto que existe una interrelación entre mutagénesis y carcinogénesis(Ames, 1983).

1. 10. Antimutagénesis

Se consideran agentes antimutagénicos a aquellas sustancias que a través de diferentes procesos inhiben, los cambios inducidos o espontáneos en la estructura del ADN, independientemente del mecanismo involucrado, (Waters y cols., 1996). Se ha tratado deliberadamente de frenar el desarrollo de las células premalignas hacia la malignidad mediante sustancias que se presenten en nutrientes comunes o bien por medio de compuestos farmacológicos sintéticos (Mon y Mentha, 1989). Las estrategias para evitar el cáncer se basan en las siguientes observaciones: 1) La iniciación y promoción del proceso carcinogénico se puede modificar *in vitro*. 2) Algunas vitaminas, iones metálicos, tocoferoles y proteínas presentan propiedades antimutagénicas o anticancerígenas. 3) Las estadísticas epidemiológicas y experimentales indican que en el desarrollo del cáncer los agentes químico ambientales, incluyendo factores dietéticos, desempeñan un papel importante (Kelloff y cols., 1994).

De Flora (1998) clasifica a los antimutágenos de acuerdo con las etapas en que ejercen sus mecanismos de acción. Los antimutágenos de primera etapa son los que actúan extracelularmente (desmutágenos), e incluyen a los agentes que inactivan a los mutágenos exógenos y previenen el daño al ADN. Los de segunda etapa actúan intracelularmente (bloqueadores), unos evitan que los compuestos genotóxicos reaccionen con sitios críticos de la célula y otros disminuyen la tendencia al error durante la replicación y la reparación del ADN. Los de tercera etapa inhiben los procesos de promoción avances y progreso tumoral, invasión y metástasis.

1. 11. Probióticos

Los probióticos son los microorganismos capaces de establecer un equilibrio microbiano en el intestino. El término significa "favorecer la vida", ya que el probiótico facilita la colonización del tracto gastrointestinal por microorganismos (Parker, 1986), a diferencia del concepto de antibiótico que significa "contra la vida". El equilibrio en el tracto gastrointestinal se debe a una proporción adecuada de la flora, entre la que predomina la productora de ácido láctico (Lyon, 1987).

Los microorganismos siempre han estado en contacto con los seres humanos, ya que constituyen parte de los ecosistemas donde el hombre subsiste. La preocupación del hombre por obtener los productos que le faciliten su desarrollo le ha llevado a emplear los microorganismos para obtener diferentes alimentos, bebidas refrescantes, alcohólicas o fermentadas, Así como en el área farmacéutica, lo que le ha permitido aumentar la producción de vacunas, así como de antibióticos, y en los últimos años su aplicación en la ingeniería genética. El uso de los microorganismos como aditivos en la alimentación y como probióticos, ha ido creciendo en los últimos años, aprovechando en este caso los efectos de los productos de los lactobacilos (Goldin y Gorbach, 1984).

1. 11. 1. Propiedades ideales de un probiótico

Para ser considerados ideales los probióticos, deben presentar las siguientes características: 1) Ser buenos productores de ácido láctico, 2) ser aprovechados por humanos y animales, 3) presentar resistencia a la acidez y a la bilis, 4) tener buen desarrollo tanto *in vitro*, como *in vivo* y 5) conservar un alta grado de recuperación y sobrevivencia, posteriores al proceso de liofilización.

Como probióticos se han empleado cultivos de microorganismos y metabolitos de éstos, teniendo predominancia los cultivos de bacterias productoras de ácido láctico, algunas levaduras y las enzimas provenientes de éstas. Los beneficios obtenidos por el uso de probióticos se reportaron desde principios del siglo XX y posteriormente diversos trabajos de investigación, han confirmado su efectividad, que en principio se obtiene al llevar a cabo la colonización adecuada en el tracto gastrointestinal. Esta colonización se desarrolla con los sustratos disponibles y contrarresta las acciones de agentes antibacterianos presentes en el medio (Hamden y Mikofajcik, 1974; Pollman y cols.,1980; Borisenko y cols,1990; Girard y Dawson, 1994; Pino, 1996). Razo (1995) comprobó la efectividad del uso de probióticos y antibióticos, en la recuperación de pacientes con infecciones gástricas y faríngeas, al valorar por separado y posteriormente de manera conjunta la acción del probiótico y del antibiótico.

1. 11. 2. Posibles mecanismos de acción de los probióticos

Una de las acciones de los probióticos es mantener los niveles adecuados de pH intestinal como medio para la regulación de flora benéfica y optimizar su actividad enzimática digestiva (Hoyos, 1990).

Cuando el pH ruminal baja a 6.0 disminuye la actividad de los microorganismos celulolíticos, pero al agregar levaduras a la dieta, éstas actúan como amortiguador del pH aumentando el desarrollo de bacterias que metabolizan lactato y estabilizando el pH ruminal (William y cols, 1983; Itasse y Orskov 1983; Hoyos, 1990).

Acción como antibióticos

Las bacterias productoras de ácido láctico mantienen un nivel apropiado de sustancias antimicrobianas que actúan contra enterobacterias como *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Shigella* y *Staphylococcus* (Fuller, 1989). Entre los metabolitos antimicrobianos producidos están la acidofilina, lactocidina en tanto que los estreptococos producen la nicina y la diplococcina.

Acción contra toxinas

Manoj y Devwgowda (2000) reportaron disminución de los efectos de la toxina T-2 (producida por *Fusarium sporotrichoides*), cuando se administraba a aves en dietas que también contenían levaduras. un efecto que se relaciona con la esterificación de los glucomananos presentes en la pared celular de éstas

Los probióticos como antimutágenos

Las evidencias indican que en un lumen intestinal con una flora microbiana normal, se presenta un buen desarrollo celular, y se estimula la síntesis de inmunoglobulinas A en la mucosa intestinal (March, 1979). En este sentido, Chorvatovicova y colaboradores (1995) demuestran que los β glucanos estimulan la respuesta inmune, contra virus, hongos y otros parásitos, y disminuyendo el riesgo de cáncer de colon y estómago debido al aumento en la actividad fagocítica y proliferativa del sistema reticuloendotelial; (Goldin y cols, 1984; William y Di Luzio, 1985; Perdigon y cols, 1986; Wagnerova y cols, 1991).

Los mananoligosacaridos, provenientes de levaduras, adsorben a las bacterias patógenas evitando que colonicen en el tracto digestivo, y no son degradables en animales monogástricos, recorren el tracto digestivo junto con los patógenos, siendo expulsados con las excretas (Newman, 1995).

Aunque el ácido láctico carece de actividad antimutagénica (Morita y cols 1990) hay experimentos que muestran que las sustancias antimutagénicas se encuentran en la pared celular de los lactobacilos, (Hosono y cols,1987). Renner y Münzner (1990) probaron la acción antimutagénica de probióticos de la dieta en experimentos *in vitro* e *in vivo*. mediante la prueba de Ames demostraron que *Lactobacillus casei*, inhibe la mutagenicidad, producida por un extrato cárnico nitrosilado. Bhattacharya y colaboradores (1987) aplicaron 50 mg/kg de busulfan a *hamsters*, y 25 mg/kg a ratones. Los animales se trataron con lactobacilos y al evaluar aberraciones cromosómicas y micronúcleos en eritrocitos policromáticos y normocromáticos, se observó un efecto anticlastogénico.

En años recientes los probióticos han tenido gran importancia para la industria pecuaria, sin embargo, su uso en humanos es todavía limitado. Los microorganismos más utilizados son: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. Gasseri*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus faecium* y *Bifidobacterium longum*. También se ha impulsado el empleo de microorganismos eucariontes como las levaduras; (*Saccharomyces cerevisiae*), que inhiben el desarrollo de microorganismos patógenos compitiendo por los nutrientes y mediante la producción de ciertos metabolitos, (Pollman y cols 1980; Rose, 1987; Dawson, 1987; Wallace, 1994; Walli, 1994;

Los lactobacilos tienen una importancia primordial en el tracto gastrointestinal por su propiedad fermentativa, lo cual permite realizar una serie de acciones a favor del hospedero, de las cuales las más sobresalientes son: cambios en la flora bacteriana y disminución de microorganismos patógenos, producción de ácido láctico, con la consecuente reducción del pH en el tracto gastrointestinal, colonización de los microorganismos al actuar como seleccionador en el sistema digestivo del animal, inhibición en la síntesis de toxinas por actividad competitiva de nutrientes y producción de antibióticos, en contra de patógenos.

1. 12. Levaduras

1. 12. 1. Generalidades acerca de las levaduras

Las levaduras se propagan fácilmente por la acción del viento y los insectos. Son organismos saprófitos porque viven de la materia orgánica, aunque algunas se desarrollan como parásitos facultativos. Se pueden desarrollar en diferentes tipos de suelos, en condiciones que están determinadas por variaciones de suelo, luz, humedad y temperatura, lo que demuestra su capacidad para vivir en medios de diversa naturaleza (Pelczar y cols, 1985)

1. 12. 2. Características bioquímicas y microbiológicas de las levaduras

La morfología y tamaño de las levaduras las distinguen de las bacterias. La ausencia de fotosíntesis las diferencia de las algas. Presentan una pared celular rígida y se les considera hongos, aunque son principalmente unicelulares. Son eucariontes que presentan cápsula como cubierta y una membrana citoplasmática formada por proteínas, polisacáridos y fosfolípidos. Se conocen unos 39 géneros con 350 especies.

El tamaño y la forma varían según la especie, la edad y el medio en que se desarrollan. Su reproducción asexual puede ser por bipartición o gemación, y la sexual por esporulación (Pelczar y col., 1985). La pared celular es muy resistente y adsorbente, y está constituida por polisacáridos, glucanos y mananos, y enzimas como las invertasas. El citoplasma se presenta en estado semilíquido, y contiene los organelos usuales (ribosomas y mitocondrias) y materiales granulares finos, enzimas como las permeasas y las acarreadoras de trealosas, que son importantes para su fisiología de sobrevivencia hídrica, ya que son organismos que no presentan órganos de locomoción. El metabolismo es aerobio/anaerobio facultativo, y el crecimiento óptimo se efectúa en un pH de 4.5 a 5.0, pero puede tolerar condiciones de mayor acidez. Se les considera quimiotróficas por obtener su energía metabólica por desaminación oxidativa o fermentación aerobia.

1. 12. 3. Cultivo de levaduras

El uso de levaduras en la alimentación animal tiene cierto auge, por ayudar al proceso digestivo en los organismos que las consumen al llevar a cabo cambios en la flora bacteriana y reducir los microorganismos patógenos (*Escherichia coli*), además de actuar como Adsorbentes al fijar algunos compuestos nutritivos, lo que permite dosificar los nutrientes, facilitando un aumento en la eficiencia alimenticia, Favorecen la colonización por los microorganismos seleccionados en el sistema digestivo del animal, proporcionan condiciones de mayor anaerobiosis, permitiendo una adecuada ausencia de oxígeno que favorezca el establecimiento de microorganismos anaeróbicos estrictos, constituyen fuente de nutrientes indispensables como aminoácidos y vitaminas favoreciendo significativamente la absorción de minerales, principalmente Zn, K y Cu, producen enzimas digestivas, como proteasas, lipasas e invertasas.

1. 13. Características de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae presenta la morfología típica de las levaduras; es cilíndrica, con un diámetro que varía entre 2 y 8 micras, con 3 a 15 micras de longitud. La membrana celular contiene permeasas y enzimas acarreadoras de treolasas (Eleutherio y cols., 1993). La pared de *Saccharomyces cerevisiae* es semi permeable y elastica, compuesta de homopolisacáridos como glucanos y mananos, así como de heteropolisacáridos como galactomananos, fucomananos y xilomananos. Esta composición de polisacáridos coincide con la presencia de diversas enzimas de tipo hidrolítico. El conjunto de polisacáridos-proteínas, le permite una interacción química y los glucanos y mananos le proporcionan el carácter inmunológico (Ballou, 1974 y 1976). Dentro de sus propiedades como alimento se ha observado que incrementa la digestibilidad de los nutrientes, incorporando con mayor facilidad la fibra, estimulando el apetito y favoreciendo la ganancia de peso.

1. 13. 1. Características de los glucanos y mananos

Los glucanos son polisacáridos de alto peso molecular, están formados por unidades de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α 1-3, β 1-3 y β 1-6 y constituyen parte fundamental de la estructura de *Saccharomyces cerevisiae*. En esta estructura los polímeros α 1-3 se asocian con formas fibrilares ya que presentan una secuencia lineal, característica que les permite aumentar el grosor de la pared. Los mananos junto con los glucanos constituyen 80% de los polisacáridos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se ha encontrado que los mananos son más abundantes en la superficie de la pared celular, envolviendo y protegiendo a los glucanos de las β -glucanasas, lo que explica la resistencia de las levaduras para formar protoplastos (células embrionarias sin membrana celular) y no actuar como inductoras de glucanasas. Los mananos se clasifican en murales o de pared, β -capsulares y secretados. Los murales son los más frecuentes en las levaduras, en tanto que los otros dos son más propios de bacterias como *Cryptococcus neoformans*.

Los mananos se obtienen fácilmente de la matriz de la pared de la levadura, al tratarla con amortiguador neutro de citrato a una temperatura de 50-60°C, proceso con el que se obtiene una mezcla de macromoléculas solubles en agua, que posteriormente se aísla por precipitación, cromatográfica de intercambio iónico o tamizado sobre columna de gel. Los mananos presentan una cadena lineal de manosas unidas por enlaces 1-6 y ramificaciones con los enlaces 1-2 y 1-3. Se ha determinado que la cadena principal de mananos se rompe por hidrólisis con anhídrido acético, y al analizarla por rotación óptica muestra unidades de sacáridos con enlaces de configuración α , lo que es un determinante antigénico (Kockova-Kratochvilova, 1990).

En 1976 Balluo y colaboradores identificaron cuatro tipos de mananos de levaduras y demostraron que los mananos de *Kloeckera brevis* y *Saccharomyces cerevisiae* presentan residuos de ácido fosfórico entre dos unidades de manosas en cada cadena, unidos por enlace fosfodiéster. Otros estudios demostraron uniones de mananos con residuos de N-acetil-glucosamina en la posición 2 de la cadena, la cual actúa como puente de unión entre el manano, la serina y la treonina.

Finalmente estudios recientes han confirmado el uso de mananoligosacáridos de la pared celular de levaduras, como moduladores de la inmunidad humoral, antibióticos e inhibidores de la toxicidad de las aflatoxinas (Stanley y cols, 2000; Fritts y Waldroup, 2000; Cotter y cols, 2000).

1. 14. Disminución de los efectos de AFB1 por la acción de *S cerevisiae*

En 1993 Stanley y colaboradores diseñaron un experimento factorial 3x2 empleando 360 pollos de un día de edad. Para ello emplearon tres concentraciones de un probiótico comercial (Yea-Sacc), formado por células viables de *Saccharomyces cerevisiae* y dos dosis de AFB1 (0 y 5 mg/kg). Las levaduras y la micotoxina se adicionaron a la dieta de aves por cuatro semanas. Se estimó la ganancia de peso y se cuantificó albúmina, proteína total, colesterol, ácido úrico, triglicéridos, la actividad de la alanina aminotransferasa, aspartatoaminotransferasa y lactato deshidrogenasa. También se obtuvieron los pesos relativos del hígado, páncreas y corazón. Los resultados del estudio indicaron que las aves con la mayor dosis de AFB1 disminuyeron su peso en 20 %, con respecto a las que no ingerieron AFB1. Las aves con dietas de AFB1 y 0.1 % de levaduras, su diferencia de peso fue de 10 %, y las aves con dosis bajas de AFB1 y probiótico, aumentaron 50 % en relación con las que no consumieron AFB1, Estos datos muestran como las levaduras favorecen la utilización del alimento y actúa como destoxicante. Con buenos resultados, como lo muestra el experimento de Devegowda (1996) quien usó el mismo producto en concentraciones de 0.0, 0.1 y 0.2 % contra concentraciones de AFB1 a 0.0, 0.5 y 1.0 µg/kg en pollos. La dieta se administró por seis semanas, evaluándose ganancia en peso, conversión alimenticia, proteína sérica total, albúmina y título de anticuerpos.

Los resultados indicaron 20 % de disminución en ganancia de peso, 40 % en proteínas totales y 65 % en los títulos de anticuerpos con la dieta de 1.0 µg/kg de AFB1. En cambio con dieta de 0.2 % de levadura de *S. cerevisiae* se presentó una recuperación significativa en el peso

1. 15. Pruebas de Genotoxicidad

Estas pruebas permiten evaluar si una sustancia tiene efecto sobre el ADN, ya sea que altere el mensaje genético, o la estructura de los cromosomas. Entre las pruebas más utilizadas están la frecuencia de micronúcleos y la de intercambios de cromátides hermanas entre otras

Micronúcleos

La prueba de micronúcleos (MN) se ha empleado con éxito como marcador de daño citogenético producido por agentes químicos, sin embargo para utilizar la prueba es necesario conocer la cinética de producción de micronúcleos y tener presentes diversos factores y condiciones que se le deben proporcionar al organismo en estudio (Salomone y Mavourneen, 1994). Los micronúcleos (MN) son corpúsculos de cromatina intracitoplásmica que se han separado del núcleo (Rigger, 1991) y se forman durante el proceso mitótico, en la etapa de anafase; los cromosomas completos o sus fragmentos pueden retrasarse en la placa ecuatorial y al reconstituirse los núcleos de las células hijas estos corpúsculos se condensan formando un núcleo de dimensiones muy reducidas con actividad independiente en el citoplasma celular, al que se denomina micronúcleo (Heddle, 1973; Schmid, 1975).

Los MN corresponden a los cuerpos de Howell-Jolly, que se encuentran con frecuencia en sangre de pacientes con problemas hematológicos. El nombre de se debe a Howell, quien en 1891 encontró por primera vez micronúcleos en los eritrocitos , y fue Jolly quien describió dichos corpúsculo (Henry, 1993).

Posteriormente, Evans intentó emplearlos como monitores del daño inducido por rayos gamma, en presencia y ausencia de oxígeno. Sin embargo fueron Schmid y colaboradores (1975) quienes desarrollaron dicha prueba, concluyendo que la presencia de eritrocitos policromáticos en médula ósea indicaba daño citogénético. El análisis de micronúcleos en ratón se fundamenta porque los eritrocitos dañados no se eliminan selectivamente por la actividad esplénica, como acontece con el sistema reticuloendotelial de la rata y el hombre (Schelgel y Mac Gregor, 1982).

Intercambio entre cromátides hermanas

El intercambio de cromátides hermanas (ICH) es resultado del intercambio de productos durante la replicación del ADN en *loci* aparentemente homólogos. El proceso se da por la ruptura y reunión del ADN, siendo los ICH el resultado de reacomodos moleculares en ciertas regiones del ADN. A estas regiones, que son unidades discretas de replicación del ADN se les conoce como replicones y están formadas de 20 a 80 orígenes de replicación divididos por ARN y proteínas. El estudio de ICH se inicia con los trabajos de Taylor (1958) quien observó por autorradiografía la presencia de intercambios cromosómicos. Perry y Wolff (1974) establecieron una metodología que incluía la tinción diferencial de las cromátides (Latt, 1981). El procedimiento incluye el uso de 5-bromodeoxiuridina (BrdU), la cual se incorpora a la célula en lugar de la timidina.

Las cromátides que no han incorporado BrdU se distinguen de las que lo incorporan al ponerse en contacto con un derivado de benzimidazol (colorante 33258 de Hoechst) que tiñe el ADN sin BrdU dando como resultado la aparición de una cromátide oscura y otra clara. Esta diferenciación permite identificar segmentos cromatídicos que presentan el proceso de intercambio. El estudio de ICH ha sido de un valor significativo en la determinación de agentes clastogénicos, por su gran sensibilidad (Kligerman y col., 1985). Con esta técnica se han clasificado los mutágenos en potentes, aquellos que inducen una frecuencia de ICH cinco veces mayor que la normal, moderados, si el incremento es el doble y débiles, si inducen menos del doble de la frecuencia basal (Salamanca, 1993).

2.- JUSTIFICACIÓN

En el presente trabajo se evaluó la capacidad antitóxica y antigenotóxica de *Saccharomyces cerevisiae* en ratones alimentados con dietas contaminadas con aflatoxina B1, con base en las siguientes observaciones;

- 1.- Se ha visto un incremento en la contaminación del maíz por aflatoxinas, aumentando con ello el riesgo de genotoxicidad en la población mexicana que lo consume, por lo que es necesario emplear sustancias y métodos que disminuyan dicha contaminación.
- 2.- Se ha visto que la aflatoxina altera el metabolismo en los organismos que la consumen, manifestándose principalmente como una pérdida de peso significativa, por lo que es urgente encontrar medios para atenuar el riesgo de toxicidad por su consumo
- 3.- Se han usado con frecuencia diferentes antimutágenos como alternativa para prevenir enfermedades en el humano, como el cáncer. Por lo que se necesario emplear antimutágenos naturales que ayuden a contrarrestar estos problemas.
- 4.-Conociendo la toxicidad de la AFB1, se requiere normar los procedimientos para el uso de productos contaminados con esta micotoxina.
- 5.-El uso de *Saccharomyces cerevisiae* en numerosos experimentos en que se manejan dietas contaminadas con aflatoxinas, ha demostrado su potencial como antimutágeno.

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos destoxificantes y antigenotóxico de *Saccharomyces cerevisiae* en ratones alimentados con maíz contaminado con AFB1.

3. 1. Objetivos específicos

- 1 Evaluar la capacidad de *Saccharomyces cerevisiae* para adsorber AFB1
- 2 Determinación de posibles cambios estructurales en AFB1, al contacto con *Saccharomyces cerevisiae*.
- 3 Evaluación de la toxicidad de AFB1
- 4 Estimar la frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas inducido por AFB1.
- 5 Determinación de la frecuencia de micronúcleos inducida por la AFB1

4. HIPÓTESIS

Considerando que *Saccharomyces cerevisiae* se ha empleado como destoxificante de AFB1, se espera que la adición de esta levadura a dietas contaminadas con AFB1, disminuya la genotoxicidad de la micotoxina.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5. 1. Medidas de Seguridad

Las medidas de seguridad empleadas en el manejo de aflatoxinas fueron el uso de cofia, gafas industriales, mascarilla con filtros de alta seguridad, guantes de cirujano y bata. En las etapas de cuantificación y purificación del extracto de aflatoxinas, se empleó una bolsa de plástico con orificios para las gafas y la mascarilla y otra bolsa de plástico suficientemente grande para el cuerpo, con orificios para los brazos, así como bolsas de plástico para cubrir las mangas y parte de las piernas. Los residuos se colectaron y se canalizaron al centro de acopio de materiales infectocontagiosos.

5. 2. Experimento *in vitro*

5. 2. 1. Cultivo de *Aspergillus parasiticus*

En cajas Petri con medio de cultivo Zapeck-Dox (Bioxon) se sembró la cepa ATCC-26691 de *Aspergillus parasiticus*, por el método de puntos separados, y se incubó a 28°C durante 10 días. Las esporas de cada caja se cosecharon en 10 ml de solución salina isotónica estéril, conteniendo Tween 80 al 1 % (Biotec). El número de esporas por mililitro se cuantificó empleando la cámara de Neubauer y se obtuvo un promedio de 2.6×10^8 esporas/ml.

5. 2. 2. Producción de AFB1 en maíz

Se empleó maíz exento de pesticidas, para evitar posibles interferencias con el desarrollo de *Aspergillus parasiticus*. Los granos se lavaron con agua corriente, y con agua destilada y se dejaron escurrir durante 10 minutos para eliminar el exceso de agua. Se separaron por lotes de 5 kg de maíz en frascos pyrex. La boca de cada recipiente se cubrió con tapón de gasa y algodón y se esterilizaron todos en autoclave a presión de 1.3 kg/cm² durante una hora.

Se inocularon cuatro frascos con 10.4×10^8 esporas/kg, cada uno, y se les añadió 100 ml de solución salina estéril al 0.85 %, para proporcionar al hongo la humedad óptima. Los frascos se incubaron a temperatura ambiente por seis semanas, rotando los frascos diariamente para favorecer las condiciones aeróbicas del cultivo y lograr crecimiento homogéneo del hongo. Posteriormente, tanto el maíz contaminado con las esporas como el testigo, se esterilizaron a una presión de 1.3 kg/cm² durante una hora con la finalidad de detener el crecimiento del hongo (Tejada, 1983)

5. 2. 2. 1. Purificación del extracto

Se añadieron 25 g de la muestra de maíz molido a 100 ml de solución de acetonitrilo agua (9:1) .La mezcla se licuó a alta velocidad durante 2 minutos. Se colocaron 5 ml del extracto en una columna de limpieza de alta afinidad (Mycosep 224), para eliminar interferencias analíticas, el extracto purificado se transfirió a un vial con tapa sellada con teflón y se evaporó a sequedad a 65 °C (Ortiz, 1992).

5. 2. 2. 2. Preparación de extracto de AFB1

Se mezclaron por un lado, los contenidos de los cuatro frascos contaminados con *A. parasiticus* y por otro los contenidos de los frascos sin contaminar. De las mezclas se tomaron tres muestras de 500 g cada una y se molieron en molino Willey con criba de 1mm. La AFB1 se cuantificó por cromatografía de líquidos de alta resolución (Ortiz, 1992; Kim y cols., 2001).

5. 2. 2. 3. Estudio cromatográfico del extracto

El contenido de cada vial se suspendió en 200 ml de acetonitrilo-agua (9:1), y se adicionaron 700 µl de una solución constituida por 4 ml de ácido trifluoracético, 2 ml de ácido acético glacial y 14 ml de agua destilada. Los viales se incubaron en baño maría a 65 °C por 9 minutos y se enfriaron con agua durante 15 segundos. Finalmente 50 µl del extracto se inyectaron al sistema HPLC.

Condiciones cromatográficas

Se empleó un detector fluorométrico: Waters 420 con monocromadores de excitación a 360 nm y emisión a 440 nm. La fase móvil fue de acetonitrilo-agua (9:1).

La columna: C-8 de 5 µ por 10 nm. a condiciones de flujo de 2 ml por minuto y tiempo de corrida de 8 minutos

5. 2. 3. Pruebas de viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*

Se utilizó el probiótico comercial Yea-Sacc¹⁰²⁶ ® como fuente de levadura. El producto presenta una concentración mínima de 1×10^8 células viables/g de probiótico, lo que se confirmó por recuento microbiano mediante método de diluciones decimales.

A partir de 1 g de probiótico se hicieron 12 diluciones decimales con solución salina fisiológica, sembrándose en cajas Petri con medio de Sabouraud (Bioxon), y se incubaron a 25 °C durante 72 h.

5. 2. 4. Contaminación del maíz en diferentes concentraciones de AFB1

Se molieron 15 kg de maíz con y sin contaminación de AFB1 respectivamente, en molino Willey con criba de 1 mm. Se mezclaron las cantidades necesarias de ambos lotes de maíz para obtener lotes de 5 kg con las siguientes concentraciones de micotoxina: 0, 150, 300, 450 y 800 µg/kg de maíz.

Desarrollo experimental in vitro

Se diseñó un experimento factorial 4X3X3, siendo los factores: 4 concentraciones de AFB1 (150, 300, 450 y 800 µg de AFB1/kg de maíz), 3 concentraciones de probiótico: 0.1, 0.2 y 0.3 %, y tres repeticiones de cada tratamiento.

Se colocaron por triplicado 50 g de maíz molido conteniendo el probiótico (0.1, 0.2 y 0.3 %) en matraces Erlenmeyer, agregando a cada uno 50 ml de una solución que contenía 1250 UI de pepsina y 150 mEq de HCL para acción digestora (tabla 1). Se incubaron en baño maría a 37 °C con agitación constante, durante 24 h; posteriormente se paso el contenido de los matraces a través de membranas Milipore de 0.22 µ de diámetro de poro. Se obtuvieron dos fases, la biomasa y el filtrado, en las cuales se cuantificó el contenido de AFB1, para así conocer el porcentaje de adsorción de AFB1 en la biomasa (Ortiz, 1992).

5. 2. 5. Determinación de cambios estructurales de la molécula de AFB1

Se mezclaron dos alícuotas de 50 g de maíz contaminado con 800 µg de AFB1/kg de maíz y 0.3 % del *S. Cerevisiae* más 1250 UI de pepsina y 150 mEq de HCL, se incubaron a 37 °C durante 24 h, posteriormente se filtraron para obtener dos fases, biomasa y filtrado residual.

De la biomasa se hizo una extracción primaria en metanol al 60 % y una purificación preparativa por el método de minicolumna, obteniéndose la AFB1 en la fase bencénica, con lo que se formaron las muestras 1 y 2 (Tejada,1983).

También se emplearon dos diluciones de un estándar comercial de AFB1 a concentraciones de 400 y 600 µg de AFB1/kg de alimento, diluidos en acetonitrilo y se les realizó un corrimiento cromatográfico, que serviría para determinar si había alguna modificación en la estructura de la AFB1 tras la exposición al probiótico

Tabla 1. Distribución de los lotes experimentales en el estudio *in vitro*

AFB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	<i>S. cerevisiae</i> (%)	UFC <i>S cerevisiae</i> / kg
0	0	0
150	0.1	1×10^8
150	0.2	2×10^8
150	0.3	3×10^8
300	0.1	1×10^8
300	0.2	2×10^8
300	0.3	3×10^8
450	0.1	1×10^8
450	0.2	2×10^8
450	0.3	3×10^8
800	0.1	1×10^8
800	0.2	2×10^8
800	0.3	3×10^8

UCF=Unidades formadora de colonias

Se realizó un barrido de 200 a 400 nm a los estándares, para determinar la longitud de onda de máxima absorbancia (figura 6). También se estimó la actividad de resolución en las dos fases móviles: acetato de etilo-hexano (3:7) y cloroformo-acetona (9:1) (figuras 7 y 8).

Las placas se analizaron en densitómetro marca Desaga, modelo CD-60 (Dickens y cols 1980), obteniéndose los espectros ultravioleta para hacer el estudio comparativo de sus estructuras.

Para el funcionamiento óptimo de los cromatogramas se emplearon dos volúmenes de las muestras problema (1 y 5 μ l), más dos de las diluciones estándar, las cuales se aplicaron en una placa de alta resolución (HPTLC) de sílica gel F-254

Las condiciones ideales para los cromatogramas fueron: Volumen de muestra 1 μ l.

Longitud de onda 254 nm. Fase móvil: cloroformo-acetona (9:1).

5. 3. Experimento *in vivo*

5. 3. 1 Preparación de las dietas

Se utilizaron lotes de maíz contaminado a concentraciones de 0, 400, y 800 μ g de AFB1/kg de maíz para elaborar las dietas de acuerdo a las recomendaciones de la literatura (NRC, 1978) (Tabla 2). Para moler el maíz, se empleó un molino Willey con criba de 1 mm y se mezcló durante 1 hora en una mezcladora Hobart MFG-Co.

Con los ingredientes señalados en la tabla 3 incluyendo el probiótico a las concentraciones de 0 y 0.3 %. Las dietas bajo experimentación se comprimieron en forma de galletas en el laboratorio (California Pellet Mill Co) para ofrecer un alimento accesible y convencional a los animales.

Tabla 2. Composición de las dietas experimentales

Ingredientes	% en la dieta
Maíz ¹	90.60
Pasta de soya	3.00
Aceite de maíz	3.00
Carbonato de calcio	0.54
Fosfato monobásico de potasio	1.14
Clorhidrato de L-lisina	0.11
D,L-metionina	0.34
Mezcla de vitaminas ²	0.50
Mezcla de minerales ³	0.70
Total	100.00 %

1. Maíz con 0, 400 u 800 µg de AFB1/kg de maíz 2. Contenido de vitaminas por kg de dieta: 500 UI de A, 150 UI de D, 20 UI de E, 2 mg de K, 600 mg de cloruro de colina, 20 mg de biotina, 0.5 mg de folacina, 10 mg de niacina 10 mg de pantotenato de calcio, 7.0 mg de riboflavina, 6.4 mg de clorhidrato de tiamina, 1.2 mg de clorhidrato de peridoxina, 0.01 mg de vitamina B₁₂, 10 mg de BHT. 3. Contenido de minerales por kg de ración: NaCl: 1.27 g, MgCO₃:1.73 g, K₂CO₃:3.54 g K₂Cr₂SO₄ :13.6 mg, CuSO₄(H₂O)₅ :17.7 mg, NaF :2.3 mg, FeSO₄(H₂O)₇ : 124.4 mg, MnSO₄H₂O : 138.4 mg, Na₂SeO₃ : 0.2 mg y ZnCO₃ :57.3 mg.

5. 3. 2. Lotes de animales para el experimento in vivo

Se emplearon 240 ratones machos cepa CD-1, recién destetados, con un peso homogéneo de 12.0 ± 0.5 g. Se separaron al azar en seis lotes de 40 ratones cada uno, distribuyéndolos de acuerdo a lo indicado en la Tabla 3).

Tabla 3. Formación de grupos experimentales

Grupo	AFB1(μg/kg maíz)	S c (%)	UFC <i>S. cerevisiae</i>/kg de dieta
1	0	0.0	0
2	0	0.3	3×10^8
3	400	0.0	0
4	400	0.3	3×10^8
5	800	0.0	0
6	800	0.3	3×10^8

UFC=unidades formadoras colonias

Los ratones se alojaron en cajas de acero inoxidable, con dimensiones de 20 X 30 cm, con cama de aserrín, y se les proporcionó agua potable y el alimento experimental a libre acceso. El medio se adecuó a una temperatura de 23 °C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, los ratones se alimentaron bajo estas condiciones durante seis semanas.

Posteriormente se les cambió la dieta, proporcionándoles a todos los grupos, alimento sin AFB1 ni probiótico durante tres semanas más, para evaluar la recuperación de los animales, posterior a la ingesta de la micotoxina. Al cabo de las semanas 0, 3, 6 y 9, se realizaron las pruebas descritas a continuación

5. 3. 3 *Determinación de ganancia de peso*

Al comenzar el experimento se pesaron los ratones(en una balanza electrónica, marca Ohaus),eliminando aquellos con un peso menor a 11.5 g o mayor a 12.5 g. Conformados los grupos, se llevó a cabo un registro de ganancias de peso durante las semanas 0, 3, 6 y 9. Para el análisis estadístico de los resultados se empleó la prueba de Kruskal-Wallis, con aproximación a J_i^2 , (Siegel y Castellan 1988; Major y cols 1993).

5. 3. 4. *Análisis de micronúcleos*

El análisis de micronúcleos se efectuó mediante la técnica propuesta por Schmid (1975). Las muestras de sangre se obtuvieron y analizaron cada semana desde la 0 y hasta la novena; se les practicó un corte de 1mm en la cola del ratón, con las gotas de sangre se hicieron frotis, que se colocaron durante 5 minutos en cajas de Coplin que contenían metanol al 10 %. Posteriormente se tiñeron con colorante de Giemsa al 4 % en amortiguador de fosfatos (pH 6.4).

Los frotis se analizaron microscópicamente con el objetivo de inmersión para cuantificar los micronúcleos presentes en 1000 reticulocitos, empleando la técnica de lectura escalonada en almenas, que se usa en el recuento diferencial leucocitario. Se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis con $p < 0.05$ (Siegel y Castellan 1988) para el análisis estadístico.

5. 3. 5. Estimación de la frecuencia de intercambio entre cromátides hermanas (ICH)

Se emplearon cinco ratones para cada grupo experimental, y la evaluación se hizo en las semanas 0, 3, 6 y 9. Se les implantó subcutáneamente, en la región anterior de la pierna izquierda, una tableta que contenía 40 mg del análogo de timina (5, bromo, 2-desoxiuridina), cuya superficie estaba cubierta con parafina al 70 %, para dosificar su liberación y absorción gradual, permitiendo así marcar diferencialmente las cromátides hermanas de la segunda división mitótica. Posteriormente se cerró la herida a los ratones con una grapa quirúrgica. Dos horas después se les administró intraperitonealmente una solución estéril de colchicina a una dosis de 5 $\mu\text{g/g}$, para detener la mitosis en metafase y observar los cromosomas.

Dos horas más tarde se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se disecaron los fémures; a éstos, se les cortaron las epífisis con tijeras, para obtener la médula ósea por perfusión de 5 ml de solución hipotónica de KCL 0.075 N a 37 °C. Las células obtenidas se colectaron en tubos para centrífuga y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C para optimizar el choque hipotónico sobre las células.

Se centrifugaron las muestras a 760 X g durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó y el paquete de células se fijó con 5 ml de una solución (3:1) metanol-ácido acético durante 30 minutos, repitiendo el proceso dos veces. Después de la segunda centrifugación se concentró el paquete celular con 0.5 ml de la solución metanol-ácido acético. Con una pipeta pasteur se goteó la suspensión celular sobre portaobjetos humedecidos con etanol al 50 por ciento. Se cuidó la altura del goteo (45 cm aproximadamente) para conseguir una dispersión adecuada de los cromosomas. Las laminillas preparadas se fijaron flameándolas y los frotis se dejaron madurar durante dos días (Latt, 1981) los cromosomas se tiñeron con colorante de H \ddot{o} echst, de acuerdo con la técnica descrita por Goto y colaboradores (1975). Se colocaron las laminillas de los frotis en cajas de Coplin, que contenían una solución de 100 μ g/ml de bisbenzimidida durante 30 minutos.

Las laminillas se lavaron posteriormente con agua destilada y se secaron a 60 °C durante 15 minutos. Se les agregaron tres gotas de una solución amortiguadora de fosfatos pH 7.0 a cada laminilla, se les colocó un cubreobjetos y se expusieron a una distancia de 2 cm de la luz negra, durante 30 minutos.

Las laminillas se lavaron con agua destilada y se secaron a 60 °C durante 15 minutos. Se volvieron a incubar en una solución amortiguadora de fosfatos-citrato a 60 °C durante 20 minutos. Finalmente las laminillas se lavaron con agua destilada, se secaron a 60 °C por 30 minutos y se tiñeron con el colorante de Giemsa al 4 % en amortiguador de fosfatos a pH 6.8 como colorante de contraste.

De cada laminilla se analizaron microscópicamente 25 metafases de segunda división para determinar la frecuencia de ICH. Los datos obtenidos se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis (Siegel y Castellan 1988).

6. RESULTADOS

6. 1. Pruebas *in vitro*

6. 1. 1. *Cuantificación de la AFB1*

En el estudio *in vitro*, el análisis cromatográfico (HPLC), del maíz contaminados con *A. parasiticus* mostró una concentración promedio de 800 µg de AFB1/kg de maíz. Mientras que en el maíz sin contaminar (testigo) no se detectó la presencia de AFB1.

6. 1. 2. *Capacidad de adsorción de AFB1 por Saccharomyces cerevisiae*

En la tabla 4 y figura 3 se presentan los resultados correspondientes al análisis de la biomasa en el maíz tratado con diferentes concentraciones de AFB1. Se observó que en la biomasa a mayor porcentaje de levadura se presenta mayor concentración de AFB1. en tanto que en los filtrados la concentración de aflatoxina disminuye a medida que se incrementa el porcentaje de levadura, es decir, existe una relación inversa respecto a los valores de aflatoxina retenida en la biomasa, en relación con la del filtrado.

La capacidad de retención de AFB1 aumenta en función de la concentración de la levadura, por ejemplo: con 150 µg de AFB1/kg alimento, la retención aumentó 2.1 veces al elevar el porcentaje de levadura de 0.1 a 0.2 %, en tanto que con una concentración de 300 µg de AFB1/kg de alimento, se triplica la capacidad de retención al agregar 0.1 % más de probiótico, y con las concentraciones de 450 y 800 µg de AFB1/kg de alimento, dicha capacidad aumenta 3.7 y 5 veces más, respectivamente.

Lo cual sugiere que el aumento en la concentración de AFB1 satura la capacidad de retención de la levadura, reduciendo su efecto sobre la AFB1. Con estos resultados se confirma que la levadura tiene límites, pero aun así hay eficiencia con 0.3 %.

En la tabla 4 y figura 3, se observa que el porcentaje de retención de aflatoxina en la biomasa de cada una de las cuatro concentraciones va aumentando al ir agregando mayor porcentaje de levadura, lo cual se hace notorio en la figura 3 con las pendientes de las curvas entre una concentración de *S. Cerevisiae* y la siguiente. En la figura 5 se presenta el efecto de *S. cerevisiae* sobre la concentración de AFB1 residual en el filtrado, observándose una disminución de ésta, como lo demuestra la pendiente de las curvas que representan a cada una de las muestras, al adicionarles 0.3 % de levadura.

Tabla 4. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) sobre la cantidad de AFB1 en la biomasa y el filtrado residual.

μg de AFB1/kg de alimento	S c %	μg de AFB1/kg en Biomasa	μg de AFB1/kg en filtrado	% Retención de AFB
150	0.1	60	85	40
150	0.2	128	18	85
150	0.3	137	7	91
300	0.1	77	219	25
300	0.2	230	65	76
300	0.3	258	40	86
450	0.1	77	367	17
450	0.2	288	155	64
450	0.3	365	83	81
800	0.1	83	713	10
800	0.2	416	378	52
800	0.3	506	285	63

Nivel de filtrado permitido por la OMS ($< 20 \mu\text{g}/\text{kg}$) (David y col., 1980).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

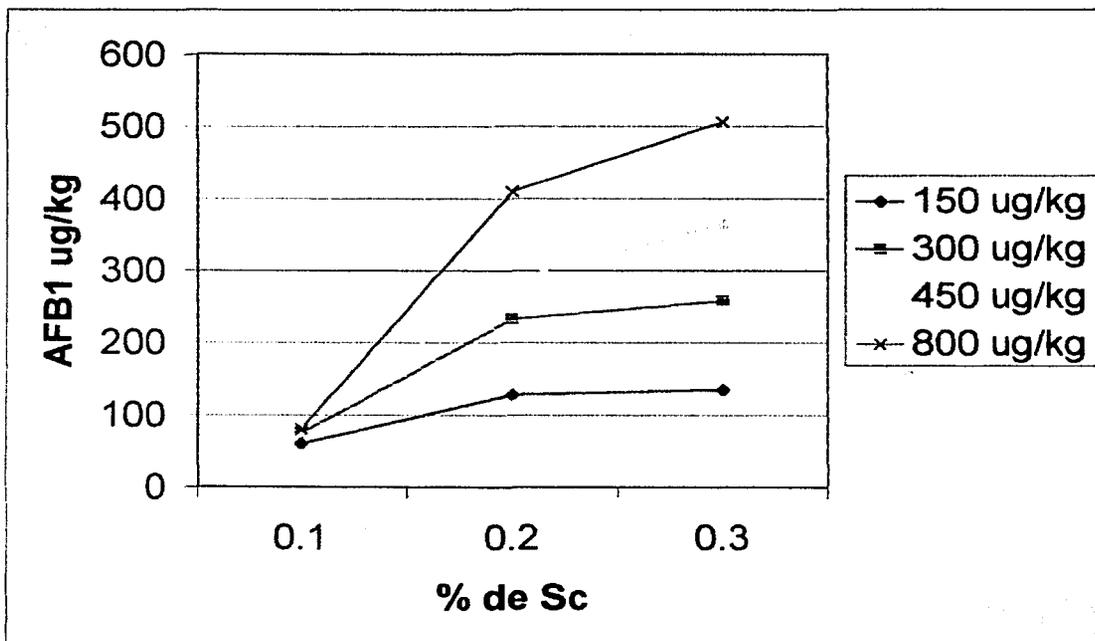


Figura 3. Capacidad de *S. cerevisiae* para adsorber AFB1

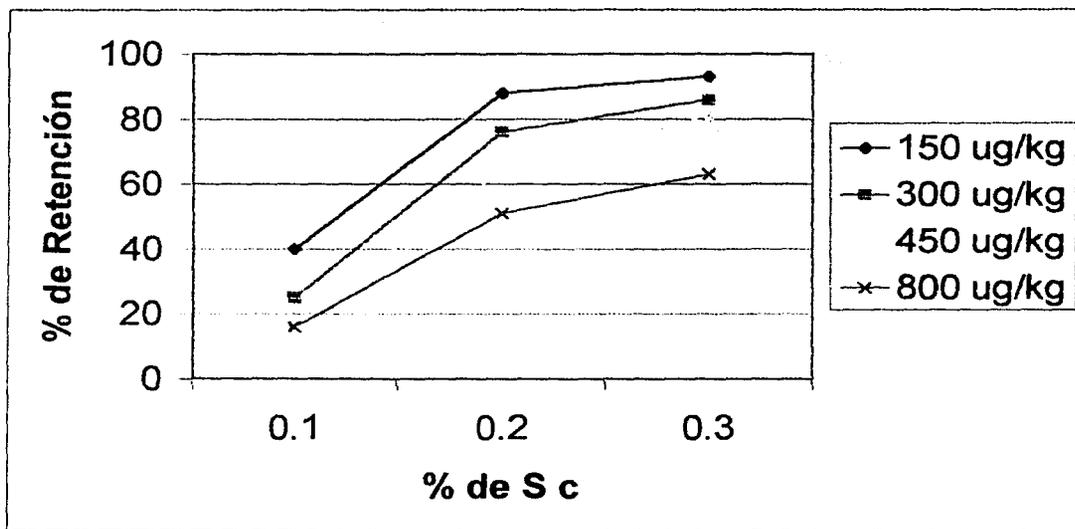


Figura 4. Porcentaje de retención de AFB1 en la biomasa de *S. cerevisiae*

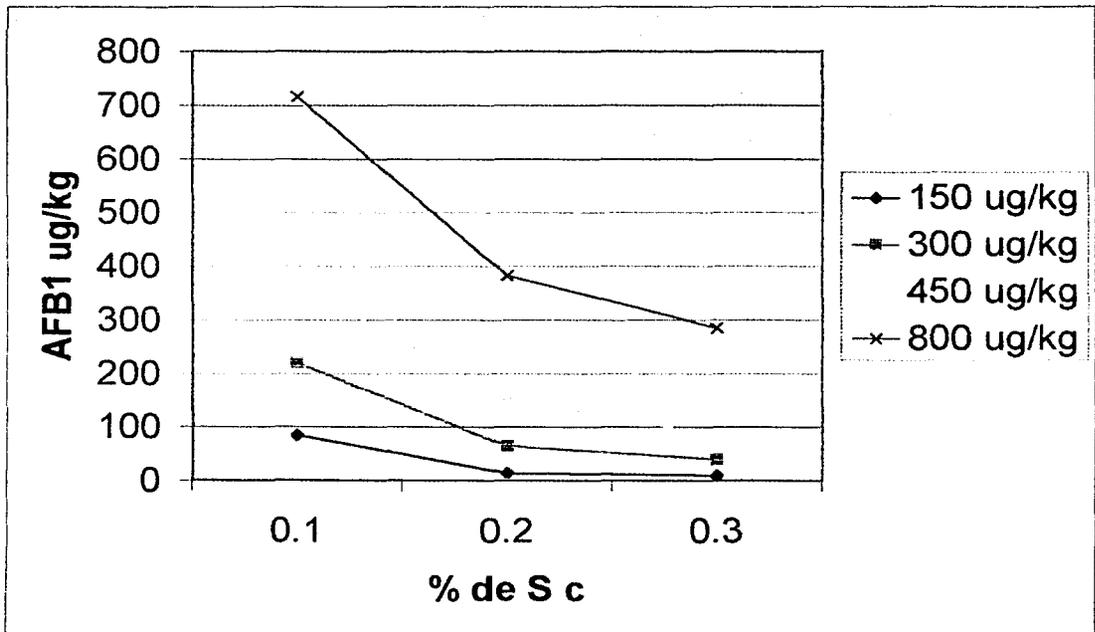


Figura 5 Efecto de *S. cerevisiae* (S.c) en la Concentración de AFB1 en el filtrado

6. 1. 3. Efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la estructura química de la aflatoxina B1

Con el objeto de contar con patrones de referencia para comparar la estructura del estándar de AFB1 con los posibles cambios que pudieran presentar las aflatoxinas después de ser expuestas a *Saccharomyces cerevisiae*, se llevó a cabo un barrido del espectro UV del estándar de AFB1 utilizando diferentes longitudes de onda (fig 6) y fase móvil cloroformo-acetona (9:1)

Los resultados del cromatograma presentaron igual índice de retención ($R_f = 0.9$), tanto para los estándares como para las muestras problemas, confirmando con ello que no se presentó modificación alguna en la estructura de la aflatoxina

Los espectros ultravioleta de los extractos purificados de AFB1 (800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de alimento) no mostraron diferencias con respecto a los obtenidos con dos concentraciones (400 y 600 μg) del estándar de AFB1 en las 2 fases móviles. Este resultado nos indica que las muestras y los estándares 1 y 2 presentan la misma estructura química,

El espectro del estándar de AFB1 nos muestra las distancias a que se presentan los picos , así como el número de éstos como parte del comportamiento que presenta esta sustancia a la longitud de onda de 254 nm, en una fase líquida de cloroformo-acetona (9:1)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

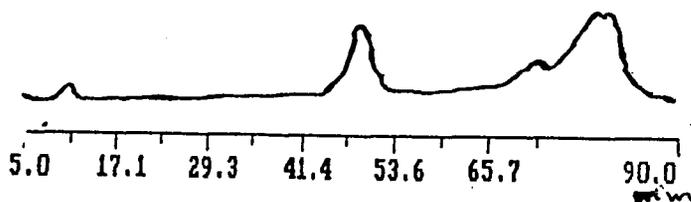


Figura 6. Barrido del espectro UV del estándar de AFB1 a 254 nm y fase móvil cloroformo-acetona (9:1)

Al hacer incidir la luz ultravioleta a la placa de cromatografía (HPLC) de las muestras y estándares de aflatoxina, a una longitud de onda de 254 nm y fase móvil de acetato de etilo-hexano(3:7), se observan los siguientes espectros. Las distancias de los picos y el número de éstos muestran que su comportamiento es similar, lo que sugiere que las estructuras químicas son iguales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

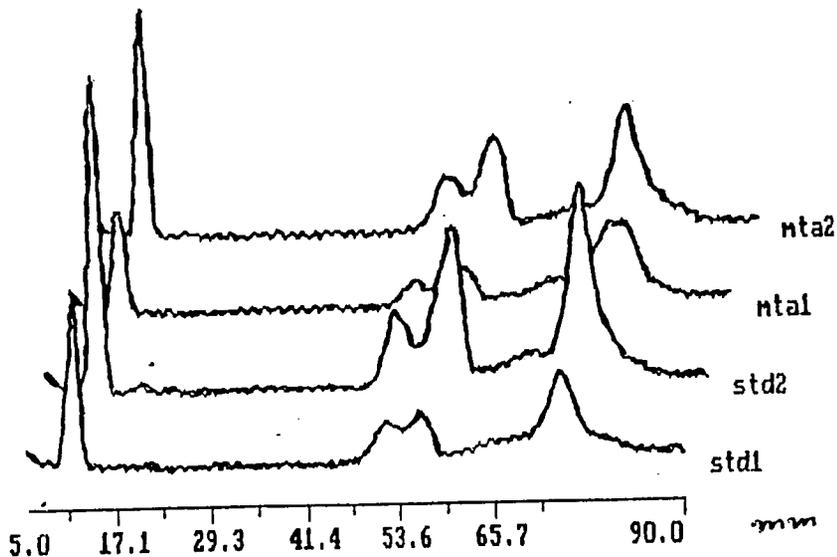


Figura 7. Espectros UV del estándar de AFB1(std 1 y std 2) y las muestras (mta 1 y mta 2) eluidas de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* con fase móvil acetato de etilo-hexano (3:7).

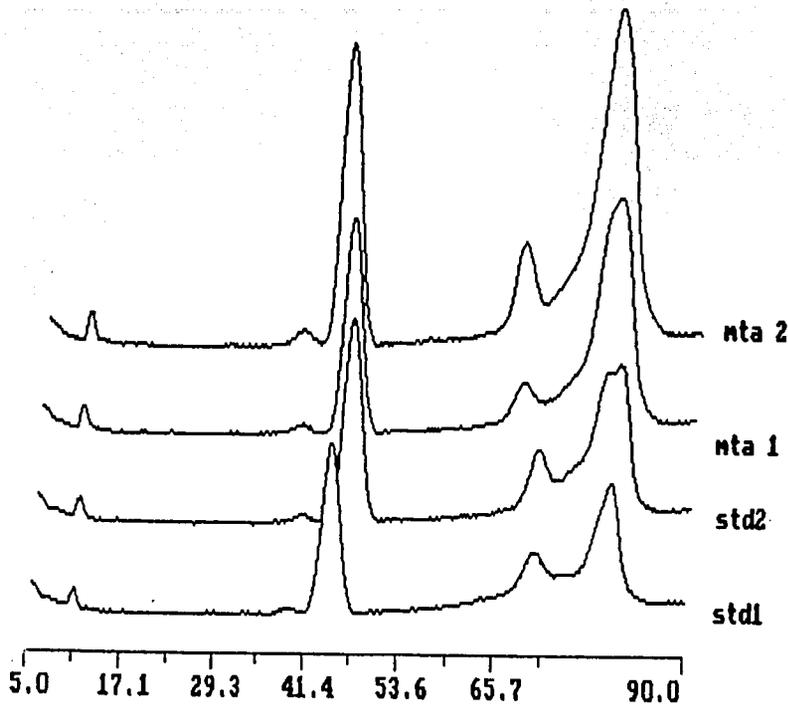


Figura 8. Espectros UV del estándar de AFB1(std 1 y std 2) y las muestras (mta1 y mta 2) eluidas de la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* en fase móvil de cloroformo-acetona (9:1)

6. 2. Pruebas *in vivo*.

6. 2. 1. *Ganancia de peso en ratones CD-I*

Se usaron 400 y 800 μg de AFB1/kg de maíz para contaminar los grupos 3, 4, 5 y 6 (Tabla 3). Los ratones pesaron en promedio 12 g y su consumo diario de alimento fue de 5 g por ratón; las dosis administradas equivalen a 1/50 y 1/25 de la DL_{50} para ratones, que es similar a la de pollos, ya que las dos especies se consideran moderadamente resistentes a la aflatoxicosis y su DL_{50} se encuentra entre 9 y 11 mg/kg. Durante las tres primeras semanas, los ratones de los grupos testigo 1 y 2, casi triplicaron su peso corporal, en tanto que los alimentados con 400 y 800 μg de AFB1/kg de maíz no llegaron a duplicar sus pesos iniciales, excepto el grupo 6. Esta diferencia es estadísticamente significativa (Kruskall Wallis, $p < 0.05$).

A la sexta semana los ratones con dietas exentas de AFB1 alcanzaron su máximo peso corporal (promedio de 35.7 g), mostrando un incremento promedio de 1.6 g a la novena semana (tabla 5). Considerando la ganancia de peso del grupo 1 como 100 %, se observa que los grupos alimentados con dietas sin aflatoxina presentan mayor peso. La adición de probiótico a la dieta con aflatoxina presenta menor ganancia con respecto al testigo, pero comparado con los que reciben aflatoxina sin probiótico, la ganancia de peso es significativa. Estos resultados sugieren que la adición de *S. cerevisiae* protege contra el efecto de la AFB1.

Tabla 5. Peso (g) en ratones alimentados con dietas preparadas con AFB₁ y tratados con *Saccharomyces cerevisiae*

Grupo	Semanas			
	0	3	6	9
	X ± DE	X ± DE	X ± DE	X ± DE
1	11.5 ± 0.41	27.1 ± 1.62	34.9 ± 2.17	36.5 ± 2.06
2	12.5 ± 0.45	29.5 ± 1.48	36.6 ± 2.36	38.4 ± 2.98
3	11.4 ± 0.36	17.2 ± 1.06 ^a	19.2 ± 1.09 ^a	21.7 ± 2.19 ^a
4	12.5 ± 0.56	21.6 ± 1.83 ^{ab}	27.0 ± 1.69 ^{ab}	29.8 ± 1.85 ^{ab}
5	11.1 ± 0.39	14.6 ± 0.68 ^a	16.1 ± 1.48 ^a	18.6 ± 1.94 ^a
6	11.3 ± 0.42	21.0 ± 2.07 ^{ab}	24.9 ± 2.17 ^{ab}	27.9 ± 2.11 ^{ab}

Grupo 1. Ratones sin AFB₁ y sin probiótico.

Grupo 2. Ratones sin AFB₁ pero con 0.3 % de probiótico

Grupo 3. Ratones con 400 µg de AFB₁/kg de maíz y sin probiótico.

Grupo 4. Ratones con 400 µg de AFB₁/kg de maíz más 0.3 % de probiótico

Grupo 5. Ratones con 800 µg de AFB₁/kg de maíz y sin probiótico.

Grupo 6. Ratones con 800 µg/kg de maíz más 0.3 % de probiótico

a= diferencia estadísticamente significativa con respecto a la semana 0

b= con respecto al grupo tratado solo con AFB₁ (Kruskal-Wallis, p<0.05)

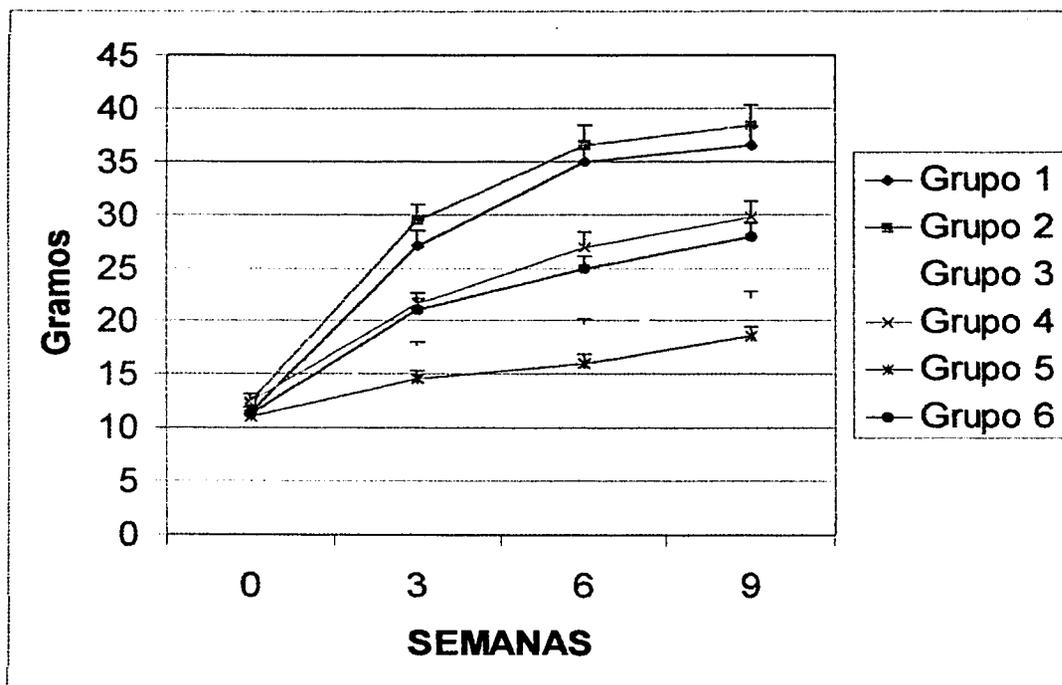


FIGURA 9. Ganancia de peso en ratones alimentados con dietas contaminadas con AFB1 y con la adición de *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ganancia de peso porcentual

Con la finalidad de contar con datos objetivos con respecto a la ganancia de peso total, y poder expresarlos en cantidades porcentuales al mismo tiempo, en la tabla 6 se presentan los valores correspondientes a las ganancias de peso porcentual obtenidos de la tercera a la novena semanas. En esta tabla se observa que los grupos de ratones tratados con aflatoxina y sin probiótico presentan una disminución de peso desde la semana tres a la novena, comparados con el grupo control, en cambio, cuando los ratones reciben dietas de aflatoxinas adicionadas con levaduras se presenta un porcentaje significativo en la ganancia de peso.

Tabla 6. Ganancia de peso porcentual

Grupo	Semana 3	Semana 6	Semana 9
1	100	100	100
2	108	104.8	105.2
* 3	63.4	55.0	59.45
** 4	79.7	77.36	81.64
* 5	53.8	46.13	50.95
** 6	77.5	71.34	76.43

* Grupos de ratone alimentados con dietas que contenían aflatoxinas

** Grupos de ratones alimentados con dietas que contenían aflatoxinas y probiótico

6. 2. 2. Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas

La frecuencia de ICH en los ratones alimentados con dietas sin aflatoxinas (grupos 1 y 2) (tabla 7, figura 10), se mantuvo en 3.0 ICH en promedio, valor que se localiza dentro del nivel normal; en cambio, los ratones alimentados con 400 µg de AFB1/kg de maíz, presentaron un promedio de ICH de 11.1, a la sexta semana, lo que representa un aumento de 3.3 veces el valor del testigo. En el grupo 4, con la misma concentración en el maíz añadida con 0.3 % de probiótico, también se observa un incremento pero de sólo 2.3 veces el del testigo. El grupo 5, compuesto de animales tratados con 800 µg de AFB1/kg de alimento, presentó el mayor aumento de ICH en la semanas tres y seis (16.4 y 19.8) respectivamente, siendo en esta última de 6 veces el valor del testigo. Al suministrar el probiótico a los ratones tratados con 800 µg de AFB1 se observó una importante reducción en el número de ICH de casi 50 % menos que el grupo anterior. Estos datos muestran un evidente efecto antígenotóxico de *S. Cerevisiae* contra el daño producido por la AFB1. En todos los lotes, durante la semana 9, la frecuencia de ICH disminuye debido a que ya se había retirado el alimento contaminado, por lo que se presenta una recuperación

TABLA 7. Frecuencia promedio de intercambio de cromátides hermanas en la médula ósea de ratones alimentados con maíz contaminado con AFB1 y tratados con *S. Cerevisiae*.

Grupo	Semanas			
	0	3	6	9
	X ± D.E	X ± D.E	X ± D.E	X ± D.E
1	3.2 ± 0.46	2.9 ± 0.31	3.3 ± 0.46	3.0 ± 0.34
2	2.8 ± 0.36	2.8 ± 0.17	3.4 ± 0.49	3.1 ± 0.45
3	3.1 ± 0.22	7.3 ± 0.61 ^a	11.1 ± 0.96 ^a	6.5 ± 0.54 ^a
4	2.9 ± 0.17	4.5 ± 0.88 ^{ab}	7.8 ± 0.94 ^{ab}	3.5 ± 0.82 ^{ab}
5	2.6 ± 0.30	16.4 ± 1.04 ^a	19.8 ± 2.47 ^a	9.2 ± 1.61 ^a
6	3.0 ± 0.48	8.9 ± 0.96 ^{ab}	9.4 ± 1.67 ^{ab}	4.9 ± 0.85 ^{ab}

a= diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor de la semana 0

b= con respecto al grupo tratado solo con AFB1(Kruskall-Wallis p<0.05)

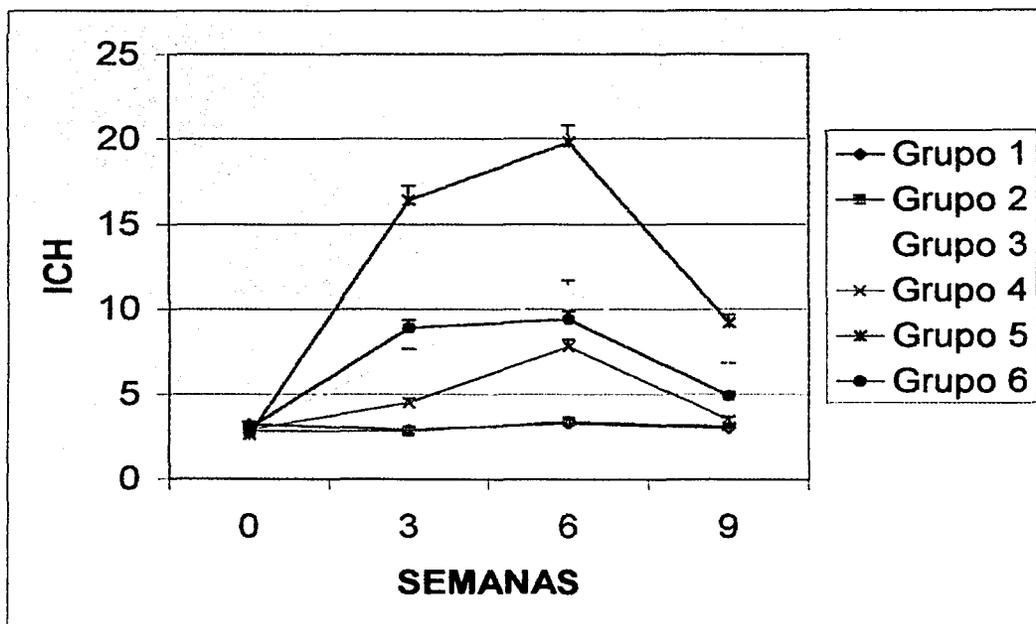


Figura 10 . Intercambio de Cromátides Hermanas en ratones alimentados con dietas contaminadas con AFB1 tratadas con *Saccharomyces cerevisiae*

6. 2. 3- Eritrocitos normocrómicos micronucleados

La frecuencia de micronúcleos en normocitos de la sangre periférica de los ratones se presenta en la tabla 8 y la figura 11. La cantidad de micronúcleos encontrados en los ratones alimentados durante nueve semanas con dietas libres de AFB1 (grupo 1) se mantuvo dentro del valor basal. En los ratones con dieta exenta de AFB1 y con el probiótico (grupo 2) se presentó un resultado similar, con un promedio de 1.87 micronúcleos/1000 eritrocitos policromáticos durante las nueve semanas. En cambio, los ratones de los grupos 3 y 5 (con 400 y 800 μg de AFB1/kg, respectivamente), a la tercera semana de exposición a la micotoxina muestran un incremento de 1.5 a 7.1 MN y de 2.0 a 21.5 MN, es decir, se elevaron 4.6 y 10.7 veces los valores basales. En los ratones de los grupos 4 y 6 alimentados con 400 y 800 μg de AFB1/kg más el probiótico, el incremento fue notablemente menor, lo cual representa una reducción del daño genotóxico de 32 y 47 %. A la novena semana todos los grupos mostraron una disminución en el número de MN, debido a la etapa de recuperación que representaba el hecho de quitar la micotoxina de las dietas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TABLA 8. Frecuencia de micronucleados en eritrocitos normocrómicos en ratones alimentados con dietas contaminadas con AFB1 y tratados con *Saccharomyces cerevisiae*

Grupo	Semanas			
	0	3	6	9
	MN	MN	MN	Mn
	X ± D.E	X ± D.E	X ± D.E	X ± D.E
1	1.5 ± 0.31	2.0 ± 0.73	1.8 ± 0.45	1.8 ± 0.26
2	2.0 ± 0.18	1.8 ± 0.15	2.1 ± 0.16	2.0 ± 0.18
3	1.5 ± 0.22	7.1 ± 2.15 ^a	10.8 ± 2.77 ^a	5.3 ± 1.02 ^a
4	1.5 ± 0.35	4.8 ± 0.70 ^{ab}	4.1 ± 0.65 ^{ab}	3.1 ± 0.73 ^a
5	2.0 ± 0.17	21.5 ± 3.66 ^a	18.2 ± 2.65 ^a	5.8 ± 1.15 ^a
6	1.5 ± 0.25	11.4 ± 1.62 ^{ab}	5.2 ± 1.00 ^{ab}	4.0 ± 0.85 ^{ab}

a= diferencia estadísticamente significativa con respecto al valor de la semana 0

b= con respecto al grupo tratado solo con AFB1 (Kruskall-Wallis, p<0.0.5)

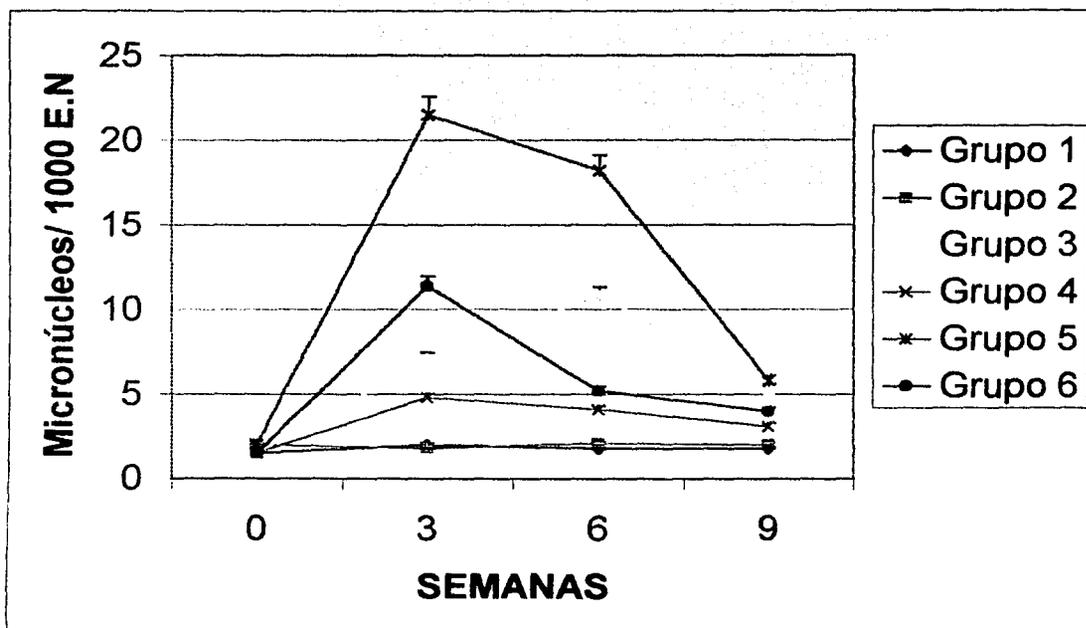


Figura 11. Frecuencia de Micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratones alimentados con dietas contaminadas con AFB1 y añadida de *Saccharomyces cerevisiae*

7. DISCUSION

Para demostrar el potencial antimutagénico de *S. cerevisiae* en los ratones, fue primordial poner de manifiesto la presencia de AFB1 en la muestra problema del presente trabajo. De ahí la importancia de la metodología aplicada para cuantificar la AFB1, y hacer implícitas algunas de sus propiedades físicas, con lo que se confirma su presencia en las muestras en experimentación

Respecto a la capacidad de *S. cerevisiae* para adsorber la aflatoxina, los resultados del presente trabajo señalan que ésta se retuvo en mayor cantidad a medida que se aumentaba la levadura. Específicamente podemos señalar que la mayor adsorción se presentó en la concentración de 150 µg de AFB1 y 0.3 % de levadura, y la menor adsorción se presentó con 800 µg de AFB1 y 0.3 % de levadura. Estos datos sugieren que el grado de adsorción se ve influido por la concentración de aflatoxina, probablemente porque al aumentar su concentración los espacios de adsorción de la levadura, se saturan. Sin embargo, nuestros resultados no coinciden con los de Devegowda y colaboradores (1995) quienes mediante un modelo similar concluyeron que la retención estaba determinada por el tiempo de incubación, ya que no observaron diferencias significativas al variar las concentraciones de AFB1 y de levadura. Es probable que la diferencia de resultados entre los dos trabajos se deba a las diferentes condiciones experimentales (tiempos de incubación, pH, purificación de la biomasa y método de análisis de la AFB1).

Más tarde, mediante el empleo de un producto comercial de mananooligosacáridos sobre dos concentraciones de AFB1 Devegowda (1996) encontró que la retención de aflatoxina por acción de *S. cerevisiae* es de 75 %, independientemente de la concentración de AFB1 empleada, y que dicha retención se debió a la interacción de la aflatoxina con los oligosacáridos de la pared celular de *S. cerevisiae*. Posteriormente, Manoj y Devegowda (2000) así como Raju y Devegowda (2000) determinaron que la presencia de los glucomananos en la pared celular de las levaduras son claves en la interacción con las aflatoxinas. Lo anterior, sugiere que la adsorción que se observó en nuestro trabajo podría deberse a uniones entre las moléculas de las aflatoxinas y los polisacáridos mananos y glucanos de la pared celular de la levadura.

El análisis de la retención de AFB1 en la biomasa proporciona un dato interesante, ya que dicho resultado permite comparar el daño que pueda ocasionar una dieta contaminada con aflatoxina con otra que además contenga levadura; por ejemplo, al analizar la concentración de AFB1 en el filtrado, se obtuvieron valores menores a 20 µg de micotoxina con 150 µg de AFB1 al adicionar 0.2 ó 0.3 % del probiótico; valores que se encuentran dentro de los parámetros internacionales permisibles para consumo humano (David y cols 1980), en tanto que al emplear una concentración de 300 µg de AFB1 y adicionarle 0.2 ó 0.3 % del probiótico, la micotoxina residual en el filtrado fue menor a 65 pero mayor a 20 µg/kg.

lo que corresponde a un nivel permisible para la utilización de alimento contaminado para especies animales con menor susceptibilidad a las micotoxinas, como aves y rumiantes (Ellis y cols 1991 ; Pier,1992).

Conociendo la capacidad de adsorción que presenta *S.cerevisiae* sobre la AFB1, se sugiere la adición de dosis mayores de levadura a las dietas contaminadas con aflatoxinas, con lo que se aseguraría una mayor retención

Por otro lado, la eficiencia de la retención de *S. cerevisiae* en la prueba *in vitro* nos muestra que la cantidad de aflatoxina que se pierde en el proceso de filtración es mínima, lo que se comprueba al sumar las concentraciones de aflatoxina de la biomasa y el filtrado, obteniéndose un valor cercano a la concentración de aflatoxina original en cada caso.

Para evaluar el probable cambio en la estructura química de la AFB1, es conveniente considerar que la suma de aflatoxina retenida en la biomasa más la del filtrado, en cada tratamiento, produjo aproximadamente la cantidad inicial de micotoxina, lo cual sugiere que ésta no se degradó durante la incubación con *S. cerevisiae*,

Este resultado coincidió con el análisis de los espectros UV de las muestras y de los estándares, los cuales mostraron corrimientos similares. Ambos resultados sugieren que no existió modificación estructural de la AFB1, y que su interacción con la levadura es mediante una adsorción de tipo físico.

Reiss (1967) describió la estructura química de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* y mostró que está constituida por los polisacáridos mananos y glucanos, los cuales se caracterizan por presentar una gran cantidad de grupos OH, que se consideran como los probables puntos de unión con varios compuestos, entre los cuales se encuentran las aflatoxinas.

Esta información confirma la activa participación que tiene la pared celular de *S. cerevisiae* sobre la aflatoxina, apoyando con ello la explicación de que la AFB1 no sufre ningún cambio al estar en contacto con la levadura, ya que sólo se adsorbe.

Con respecto a la ganancia de peso, los resultados de nuestro trabajo indican que el efecto tóxico de la AFB1 sobre los ratones se manifestó en forma dependiente de la dosis y el tiempo de exposición a la AFB1, ya que al aumentar la concentración de la micotoxina, o el tiempo de alimentación con dietas contaminadas, aumentó la acción tóxica expresada como una menor ganancia de peso. Esto demuestra que las concentraciones de (400 y 800 µg de AFB1) administradas sin probiótico son suficientes para producir dichos efectos de toxicidad

Además Rao y Joshi, (1993) y Lesson y cols, (1995), encontraron una disminución en la ganancia de peso al administrar AFB1 sin probiótico durante 4 semanas, con lo que se ocasionaba un síndrome de mala absorción caracterizado por estatorrea, disminución de sales biliares, lipasa pancreática, tripsina y amilasa, en tanto que con la misma concentración de Aflatoxina, pero administrada durante una semana, la ganancia de peso no disminuyó de manera significativa, con lo que se sugiere que el tiempo de exposición influye a la toxicidad.

Los resultados del presente trabajo, también coinciden con los de Giambrone y colaboradores (1985) quienes observaron que una dosis alta de aflatoxina administrada a pollos les produce una baja significativa en la ganancia de peso, acompañada de lesiones microscópicas como proliferación de conductos biliares y cambio graso en hepatocitos. En cambio al administrar la mitad de dicha dosis durante el mismo tiempo de tratamiento, no se afectó la ganancia de peso, ni hubo daño histopatológico en el hígado, evidenciando nuevamente la relación dosis-respuesta de las aflatoxinas. Considerando el informe anterior y nuestros resultados se establece que los efectos de la aflatoxina producen efectos similares en ambas especies.

La disminución en la ganancia de peso, se puede explicar bioquímicamente si consideramos que la AFB1 es biotransformada por una oxidasa de la fracción microsomal al metabolito altamente electrófilo, 8,9-epóxido, el cual puede unirse a diversas macromoléculas y alterar la actividad de procesos como: glucogenogénesis, síntesis de ácidos grasos, transporte de electrones en los citocromos, fosforilación oxidativa, síntesis de proteínas, transporte y metabolismo de lípidos. Una o más alteraciones en estas actividades explica la reducción en la ganancia de peso (Hsieh, 1979; Pier y Cols 1980; Markley y col., 1987; Leeson y Cols 1995).

Teniendo presente los efectos tóxicos de las aflatoxinas y su relación con la ganancia de peso en los organismos que los consumen, es necesario considerar que la eliminación de la micotoxina no es tan rápida. En este sentido, Gregory y colaboradores (1983) evaluaron la velocidad de eliminación de AFB1 y sus metabolitos, y demostraron una alta concentración de AFB1 en hígado, mientras que las de aflatoxicol fueron muy bajas, lo que sugiere que este paso de biotransformación no es tan rápida.

Como se puede ver en los resultados, la ganancia de peso en los ratones se presenta a partir de que las levaduras se añaden a la dieta con AFB1, disminuyendo su toxicidad, lo cual probablemente se deba a que la aflatoxina se conjuga con la levadura mediante el fenómeno de adsorción.

Este resultado coincide con los de Osborne (1982), quien demostró los beneficios del uso de levaduras en dietas contaminadas con AFB1.

La determinación de daño al ADN, producido por agentes ambientales requiere la aplicación de procedimientos de detección eficaces, como la evaluación del intercambio de cromátides hermanas y de los micronúcleos.

En el presente trabajo la frecuencia de ICH se incrementó claramente por acción de las aflatoxinas, efecto que tiene como origen la interacción del metabolito 8,9-epóxido con el ADN, mediante el cual se forman aductos que podrían resultar en mutaciones génicas y/o cromosómicas, así como en eventos como la formación de ICH. El efecto genotóxico es dependiente del incremento de la dosis de AFB1 y el tiempo de exposición, probablemente por el aumento en la producción de epóxido y de aductos en el ADN

Los resultados obtenidos en los animales tratados con levaduras demuestran que el probiótico no es genotóxico, ya que a lo largo del estudio la frecuencia de ICH fue similar a la que presentó el grupo testigo. Hasta ahora no se tiene una información contundente sobre efectos tóxicos de las levaduras, ya que su uso ha sido como sustancia que favorece el equilibrio de la flora en el tracto gastrointestinal, o también, probablemente se deba a que los polisacáridos que constituyen la pared celular de las levaduras son moléculas de gran tamaño que no atraviesan la membrana plasmática del intestino y no puedan ser asimiladas.

De acuerdo con nuestra hipótesis, las levaduras tienen la capacidad de adsorber a las aflatoxinas y por consiguiente disminuyeron la inducción de ICH producidas por la AFB1. Esto sugiere que la adsorción se debe a que la aflatoxina es atrapada por los componentes de la pared celular de la levadura disminuyendo la toxicidad de la micotoxina.

Cuando se retira el alimento contaminado la frecuencia de ICH, se acerca al valor del grupo testigo, pero siempre muestra una leve elevación, probablemente por el efecto que produce la aflatoxina residual. En este sentido es conveniente mencionar que la AFB1 se puede almacenar en tejido graso y liberarse lentamente (Lesson y cols 1995). El presente trabajo pone de manifiesto la importancia de los experimentos de Takaji(1989), quien de manera objetiva muestra las ventajas de esta metodología , la cual no sólo puede ser usada *in vitro*, sino también nos muestra la opción de utilizarla *in vivo*.

La evaluación de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos en sangre periférica, ha sido ampliamente usado con resultados positivos para demostrar la genotoxicidad de numerosas sustancias (Serramo y Montero, 2001). Los resultados del presente trabajo ratifican la utilidad de este sistema, ya que la frecuencia encontrada en el grupo control fue baja y dentro de los límites observados por varios autores (Styles y cols, 1983; Barale y Giorgellif, 1985; Márquez y cols, 1993).

En cambio, la técnica puso de manifiesto el daño producido por la AFB1. Se observó un efecto significativo a partir de la tercera semana, el cual dependiente de la concentración y el tiempo de exposición. La prueba de micronúcleos es rápida y eficaz para evaluar alteraciones del material genético en la médula ósea, cuando el organismo se expone a micotoxinas. (Mac Gregor, 1990; Chaubey, 1993).

Sin embargo el estudio de micronúcleos en eritrocitos normocromáticos es el adecuado en estudios subcrónicos porque en ellos las células maduras están en la circulación, lo que presenta una apreciación correcta y la posibilidad de detectar efecto acumulativo. La medición del daño producido por la AFB1 coincide con los resultados obtenidos por Márquez y cols, (1993), quienes observaron que al eliminar a la micotoxina de las dietas se eliminaba el daño genotóxico. En lo que respecta a los resultados obtenidos entre la semana 6 y 9, ya sin la presencia de la micotoxina, la recuperación fue similar a la que se presentó en el estudio con ICH, lo que parece confirmar la necesidad de más tiempo para eliminar los residuos de la micotoxina. La actividad antigenotóxica que observamos con *S. Cerevisiae* coincide con el estudio efectuado por Park y Son (1989), quienes redujeron la inducción de micronúcleos por AFB1, al inactivarla con la adición de *S. Cerevisiae*. Nuestros resultados sugieren que la antigenotoxicidad podría residir en los polisacáridos que constituyen la pared celular de la levadura, posibilidad que se apoya al integrar esta información con los resultados del experimento *in vitro*, donde se demostró la adsorción de la micotoxina por la levadura, sin implicar cambios estructurales en la molécula de AFB1.

Es probable que la adsorción produzca la formación de un complejo que no se pueda absorber en el tracto gastrointestinal de los organismos que lo consumieron y sea eliminado acarreado a los mutagenos. Sin embargo, también es probable que una parte de las mismas pueda aun actuar sobre el ADN, por lo que la cantidad del probiótico y su tiempo de acción serían importantes factores para optimizar el proceso. Estos resultados confirman los beneficios del empleo de las levaduras como sustancias detoxificantes.

8. CONCLUSIONES

1. Se demostró que *Saccharomyces cerevisiae* adsorbe a la AFB1 La mayor capacidad de adsorción *in vitro* se obtuvo a una concentración de 0.3 % de levadura y 150 µg de AFB1.
2. Se demostró una relación inversa entre la concentración de AFB1 y la capacidad de adsorción de *S. cerevisiae* disminuye.
3. Se estableció que la interacción entre la levadura y la AFB1, no altera la estructura química de la AFB1.
4. Se determinó que el consumo de aflatoxina produjo una disminución de peso y daño genotóxico dependiente de la dosis y el tiempo de exposición.
5. Se observó que la adición de *S. Cerevisiae* (0.3 %) adicionado a las dietas contaminadas con. AFB1 disminuyó significativamente los efectos de la aflatoxicosis de los ratones y el daño genotóxico producido por la micotoxina.
6. El análisis de la frecuencia de ICH y de micronúcleos mostró una inhibición genotóxica al adicionar 0.3 % de probiótico (constituido por microorganismos viables de *Saccharomyces cerevisiae*) a las dietas contaminadas con AFB1

7. El probiótico demostró una acción protectora contra los efectos genotóxicos de la AFB1, que disminuye en relación con la concentración de la aflatoxina, es decir, con la capacidad de adsorción del probiótico.
8. Es necesario conocer la concentración del contaminante en el alimento para ajustar la cantidad de probiótico que se usará para proteger contra sus efectos.
9. Se requiere realizar más estudios que permitan determinar otros beneficios de *S. Cerevisiae*, para sugerir dosis en complementos alimenticios en las dietas cotidianas tanto para consumo humano como para animales.

9. BIBLIOGRAFIA

Adams, S. P., Laws G. M., Storer R. D., De Luca J. G., Nichols W. 1996. Detection of DNA damage induced by human carcinogens in acellular assays potential application for determining genotoxic mechanisms. **Mutat. Res.** 368: 235–248.

Aguilar, F., Hussain, S. P., y Ceruti P. 1993. Aflatoxin B1 induces the transversion of G → T in codon 249 of the tumor suppressor gene in human hepatocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 90: 8586–8590.

Albert, L.A. 2001. Toxicología Industrial "Curso Taller". Octubre 1-5 de 2001. **Universidad Autonoma Metropolitana U-I.**

Antonacci, L., Salvat A. E., Faifer G. C., Godoy H. M. 1999. Suppression of spore germination and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* during and after exposure to high levels of phosphine. **Mycopathologia** 147: 83-87

Ashoor, S. H., Chu F. S. 1975. Reduction of aflatoxin B2a with sodium borohydride: **Agric. Food Chem.** 23: 445–447.

Austwick, P. K., Ayrest G. 1963. Toxic products in groundnuts. Groundnut microflora, and toxicity. **Chem. Ind.** 2: 55–61.

Ballou, C. 1974. Some aspects of the structure, biosynthesis and genetic control of yeast mannans. **Adv. Enzymol.** 40: 239.

Ballou, C. 1976. Structure and biosynthesis of the mannan component of the yeast cell wall envelope. **Adv. Microb. Physiol.** 14: 93–158.

Barale, R., Giorgellif A. 1985. Benzene induces micronuclei in circulating erythrocytes of chemically treated mice. **Mutat. Res.** 144:193 – 196.

Bayman, P., Cotty P. J. 1993. Genetic diversity in *Aspergillus flavus* association with aflatoxin production and morphology. **Can. J. Bot.** 71: 32 – 31.

Bhattacharya, R. K., Francis A. R., Shetty T. K. 1987. Modifying role dietary factors on the mutagenicity of aflatoxin B: in vitro effect of vitamins. **Mutat. Res.** 188: 121–128

- Blaxter, K. L., Clapperton U. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. **Br. J. Nutr.** 19: 511-512.
- Blount, W. P. 1961. Turkey Disease. Turkeys. **J. Brit. Turk. Feder.** 52: 55-58.
- Bolaños, A. S. 1997. Aflatoxinas en leche, metodología para la elaboración de una propuesta para medidas de control. **Memorias del 11 Simposium Latinoamericano de micotoxinas:** 18-21.
- Borisenko, A. E., Mirskaya E.E., Borisenko E. G. 1990. Changes in the mutagenic activity of media, containing aflatoxin B, resulting from development of yeast. **Gig. Sanit.** 12: 45-47.
- Braun, R., Matcel 1. 1993. Chromosome analysis of mice hepatocytes treated with chemical mutagens. **Exp. Onkol.** 15 (4): 25-33.
- Buchi, G., Rae I. D. 1969. The structure and chemistry of the aflatoxins en: **Goldblatt, L. A (ed) Aflatoxins.** Academic Press, New York: pp. 55-56
- Cairns, J. 1975. Mutational Selection and the natural history of cancer. **Nature.** 55:197-200.
- Carbajal, M. 1992. Control programme of aflatoxins of corn in México. **VIII International IUPAC Symposium on mycotoxins and phycotoxins.** México: 31-34.
- Carbajal, M. 1997. Aductos de aflatoxina B1 y su asociación con algunas neoplasias. **II Simposium Latinoamericano de micotoxinas.** México: 16.
- Carro, M. D., Lebzien P., Rhor K. 1992. Influence of yeast culture on the *in vitro* fermentation (Rusitec) of diets containing variable portion of concentrates. **Anim. Feed. Sci. Technol.** 37: 209-220.
- Cartwright, C. P. Jurozek J. Beavan M. J., Rugby F. M., De Morais S.F., Rose H. 1986. Ethanol dissipates the proton motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.** 132: 369-377.
- Cassand, P., Daubeze M., Decoudu S., Leveque F., Narbonne J. F. 1990. Effect of vitamin A dietary intake on *in vivo* damage induced by aflatoxin B1 in rat liver. **Mutat. Res.** 234 : 373-374.
- Cassand, P., Decoudu S., Leveque F., Daubeze M., Narbonne J. 1993. Effect of vitamin E dietary intake on *in vitro* activation of aflatoxin B1. **Mutat. Res.** 319: 309-316

Cotter, P. F., Malzone, A., Paluch, B., Lilburn, M. S., Sefton, A. E. 2000. Modulation of humoral immunity in commercial laying hens by a dietary probiotic. **Poultry Science Association 89th Annual Meeting**. Canada. 79: 38.

Chase, L. E. 1987. Trace mineral nutrition of dairy cows. **Proceedings of the Cornell nutrition Conference for Feed Manufacturers**. Cornell University, Ithaca, New York.: 74-79.

Chen, C. J., Pearson A. M., Coleman T. H., Gray M., Pestka J. J. Y Aust S.D., 1984. Tissue deposition and clearance of aflatoxins from broiler chickens fed a contaminated diet. **Fd. Chem. Toxicol.** 22: 447-451.

Chen, C. J., Zhang Y. J., Lu S. N. y Santella R.M. 1992. Aflatoxin B1 DNA adducts in smeared tumor tissue from patients with hepatocellular carcinoma. **Hepatol.** 16: 1150-1155.

Chiple, J. R., Mabee M.S., Applegate K. L. y Dreyfuss M. S. 1974. Further characterization of tissue distribution and metabolism of (14 C) aflatoxin B1 in chickens. **Appl. Microbiol.** 28: 1027-1029.

Chorvatovicova, D. y Navarova. 1992. Suppressing effects of glucan on micronuclei induced by cyclophosphamide in mice. **Mutat. Res.** 302: 207-211.

Chorvatovicova, D., Kováčiková Z. Sandula J., and Navarová J. 1993. Protective effects of sulfoethylglucan against hexavalents chromium. **Mutat. Res.** 302: 207-211.

Chorvatovicova, D. y Sandula J. 1995. Effect of carboximethyl-chitin-glucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutat. Res.** 346: 43-48.

Chorvatovicova, D., Machova E., Sandula J. 1996. Effect of ultrasonicated carboxymethylglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. **Mutat. Res.** 371: 115-120.

Choy, W. N. 1993. A review of the dose-response induction of DNA adducts by aflatoxin B1 and its implications to quantitative cancer-risk assessment. **Mut. Res. Rev. in Gen. Toxicol.** 296: 181-298.

Cole, R. J., Cox R. M. 1981. **Handbook of toxic fungal metabolites**. Ed. Academic Press USA: 1-16.

Columbe, R. A. 1993. Biological action of mycotoxins. **J. Dairy Sci.** 76: 880-891.

- Corrier, D. E. 1991. **Mycotoxins: Mechanisms of immunosuppression. Vet. Immun. Immunopath.** 30: 73–87.
- Croy, R. G., Essigmann J. M., Reinhold V. N., Wogan G. N. 1978. Identification of the principal aflatoxin B₁-DNA adduct formed in vivo rat liver. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 75:1745–1749.
- Dalezios, M., Hsieh D. P., Wogan G. N. 1973. Excretion and metabolism of orally administered aflatoxin B₁ by Rhesus monkeys. **Fd. Cosmet. Toxicol.** 11: 605–616.
- Davis, N. D., Dickens J. W., Freie R. L., Hamilton P.P., Shotwell O. L., Wyllie T. D. 1980. Protocols for surveys, sampling, postcollection handling and analysis of grain samples involved in micotoxins problems. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.** 63: 56–62
- Dawson, K. A. 1987. Mode of action of yeast culture yea-Sacc in the rumen: A natural fermentation modifier. **Biotechnology in the feed industry.** en T. P. Lyons, Alltech Thecnical Publications. Nicholasville, USA : 119–125.
- Dawson, K. A., Newman K. E., Boling J. A. 1990. Effects of microbial supplements with taining yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. **J. Anim. Sci.** 68: 3392–3394.
- Dawson, K. A. 1993. Yeast culture as feed supplements for ruminants: Mode of action and future applications. **J. Anim. Sci.** 71: 280.
- De Flora, S. 1998. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutat. Res.** 402: 151–158.
- D'Souza, D. H., Brackett R.E. 2001. Aflatoxin B₁ degradation by flavobacterium aurantiacum in the presence of reducing condition and seryl and sulfhydryl group inhibitors. **J. Food. Prot.** 64: 268-271.
- Devegowda, G., Aravind B. R., Morton M. G., Rajedra K. 1995. A biotechnological approach to counteract aflatoxicosis in broiler chickens and duckling by use of *Saccharomyces cerevisiae* **Proc. Feed. Ingrid.** Singapore, 12: 161–171.
- Devegowda, G., Arvind B. T. R., Morton M. G. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* and mannanooligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers. **Proc. Aust. Poul. Sci.** Australia. 8: 103–106.

Devegowda, G., Arvind B. T. R., Morton M. G. 1997. Inmunosupresión en aves causada por aflatoxinas y su atenuación mediante *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sac¹⁰²⁶) y mananoligosacáridos (Mycosorb). En memorias de la 7th **Ronda Latinoamericana y del del Caribe de Alltech**. México: 21–33.

Dickens, J. W., Mc Clure W. F., Whitaker T. B. 1980. Densitometer equipment for rapid quantitation of aflatoxins on thin layer chromatograms. **J. Ser. North Carol. Agricultural Research Service**. Raleigh. N. C : 25–56.

Eleutherio, E. C., Araujo P. S., Panek A. D. 1993. Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioche. Biophys. Acta**. 1156: 263–266.

Ellis, W. O., Smith J. P., Simpson B. K., Oldham J. H. 1991. Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organism, detection, and methods of control. **Critical Rev. Food Sci. Nutr.** 30: 403–439.

Endo-Ichikawa, Y., Khono H. Tokunaga R., Taketani S. 1995. Induction in the gene RNR3 in *Saccharomyces cerevisiae* upon exposure to diferent agents related to carcinogenesis. **Biochem. Pharmacol.** 50: 1695–1699.

Evans, H. J. 1977. Molecular mechanism in the induction of chromosome aberrations. Progress in **Genetic Toxicology**. North Holland, Amsterdam: 115–119.

Fallon, R. J., Harte F. J. 1987. The effect of Yea-Sacc inclusion in calf concentrate diets on calf performance. **Irish Grass. Anim. Produc. Assoc. J.** : 156–162.

Flores, C. E., Ávila G. E., Morales B. E., Arias N. J. 1993. Valor alimenticio de la levadura tórula en dietas para aves. **Vet. Mex.** 24: 145–147.

Fritts, C. A., Waldroup, P. W. 2000. Utilization of Bio-Mos mannanoligosaccharude in turkey diets. **Poult. Sci. Assoc.** Canada. 79: 29

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animals. **J. Appl. Bact.** 66: 365–378.

Giambrone, J. J., U. L. Diener, N. D. Davis, V. S. Panangala., Hoerr, F.J. 1985. Effects of punfied aflatoxin on broiler chickens. **Poult. Sci.** 64:852-858.

Girard, I. D., Dawson K. A. 1994. Effect of yeast culture on the growth of representative ruminal bacteria. **J. Anim. Sci.** 77: 300–304.

Goldin, B. R., Gorbach S. L. 1984. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. **Am. J. Cin. Nutr.** 39: 756–761.

- Goñi, E. A., Tejada de H. I. 1987. Inactivación de AFB1 con metabisulfito de sodio. **Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México.** pp. 48.
- Gorski, T., Gorska E., Odlanicki J., Sikora M. 1991. Inhibitory effect of ellagic acid on genotoxicity induced by aflatoxins B1 y G1. Relevance to human cancer of N-nitroso compounds tobacco smoke and mycotoxins. **IARC Scientific Publications**, Lyon, France; International Agency for Research on Cancer: 550-551.
- Goto, K. A., Kanatsu T., Shinatsu H. 1975. Simple differential Giemsa staining of sister chromatide after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. **Chem.** 53: 223-230.
- Gregory, J. F., Golstein S. L., Edds G.T. 1983. Metabolite distribution and rate of residue clearance in turkeys fed a diet containing aflatoxin B1. **Fd. Chem. Toxicol.** 21: 463-467.
- Guarino, G. R. 1983. Aspectos sobre el almacenamiento de granos en el medio rural de México. **Memorias del Coloquio Internacional sobre la Conservación de semillas y granos almacenados.** Instituto de Biología, UNAM, México: 130-146.
- Guizar-Vázquez, J. 1994. **Genética Clínica.** Ed. El manual Moderno. 2^a ed. México. Pp 20, 39-46.
- Hamden, E., Micofajcik E. M. 1974. Acidolin, an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Antibiotics.** 27: 632-636.
- Hamilton, P.B. 1987. Why the animal industry worries about mycotoxins. **Proceedings of the Symposium on Recent Developments in the Study of Mycotoxins**, Rosemont, IL, USA, 17 December: A3-A9.
- Hao, D. Y., Brackett R. E. 1989. Growth and survival of *Flavobacterium aurantiacum* in peanut milk. **J. Food. Protec.** 52: 165-168.
- Harland, E. C., Cardeilhac P. T. 1975. Excretion of carbon-14 -labeled aflatoxin B1 viable, urine and intestinal contents of the chicken. **Am. J. Vet. Res.** 36: 909-912.
- Harvey, R. B., Kubena L. F., Philips T. D., Corrier D. E., Elissalde M. H., Huff W. E. 1991. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. **Am. J. Vet. Res.** 52: 152-156.
- Heddle, J. A. 1973. A rapid in vivo test for Chromosomal damage. **Mutat. Res.** 18: 187-190.

Henry, J. 1993. **Diagnóstico y tratamiento clínico**: Ed. Salvat. España: 603-631.

Hosada, M., Hashimoto H., Hiramatsu M., Morita H., Hosono H. 1993. Inhibitory effect of milk cultured with *Lactobacillus acidophilus* LA1 06 (LA2) on mutagenicity of aflatoxin B1. **Jap. J. Dairy. Food. Sci.** 42: A1-A5.

Hosono, A., Yoshimura A., Otani H. 1987. Antimutagenic activity of cellular component of *Streptococcus faecalis* IFO-12965. **Neth. Milk Dairy J.** 41: 239-245.

Hoyos, G. 1990. Efecto de un aditivo a base de microorganismos viables (probiótico) en la producción lechera y el contenido de grasa en la leche de vacas Holstein en dos niveles de producción. **Biología en la industria de la alimentación animal** Ed. Apligen 1: 51-59.

Hoyos, G. 1990. Impacto de la biotecnología en la alimentación de equinos. Revisión bibliográfica. **Biología en la industria de la alimentación animal**. Ed. Apligen, México: 61-70.

Hsieh, D. P., Wong Z. A., Wong J. J., Michas C., Ruebner B. H. 1977. Comparative metabolism of aflatoxin en: Rodricks J. V., Hesseltine C. W., Mehnam M. A. (Eds.). **Micotoxins in Human and Animal Health**, Pathotox Publishers, USA: 37-50.

Hsieh, D. P. 1979a. Utilization of aflatoxin-contaminated feed. Interaction micotoxins in animal production. **Nat. Acad. Sci. USA**: 185-195.

Hsieh, D. P. 1979b. Basic metabolic effects of mycotoxins. Interactions micotoxins in animal production. **Nat. Acad. Sci. USA**: 45-53.

Huff, W. E., Doerr J. A., Wabeck C. J., Chaloupka., May J. D., Merkley J. W. 1983. Individual and combined effects of aflatoxins and ochratoxin A on bruising in broiler chickens. **Poult. Sci.** 62: 1764-1771.

Hyginio, C. L. 1997. Micotoxin in animal production. **Memorias del 11 Simposium Latinoamericano de Micotoxinas**. México: 11-14.

IARC. 1979. IARC monographs, suppl. 1. Chemicals and Industrial Processes Associated with Cancer in Humans : Lyons France: **International Agency Reseach Cancer**.

IARC. 1999. Monograph N° 148. Metabolic Polimorphisms and Susceptibility to cancer. **International Agency Reseach Cancer**.

INIFAP. 1997. Reducción del riesgo de contaminación por aflatoxinas en maíz. **Tecnologías Llave en Mano**, INIFAP-SAGAR: 61-62.

Itasse, L., Orskov. E. R. 1983. The correlation between extent of pH depression and degradability of washed hay in sheep given hay and concentrate. **Proc. Nutr.Soc.** 42: 32a

Ito, Y., Ohnishi S., Fujie K. 1989. Chromosome aberrations induced by aflatoxin B1 in rat bone marrow cells *in vivo* and their suppression by green tea. **Mutat. Res.** 222: 253-261

Ito, Y., Peterson S. W., Wicklow D. T., Goto T. 2001. *Aspergillus pseudotamarii*, a new aflatoxin producing species in *Aspergillus* section *flavi*. **Mycol. Res.** 105:233-239.

Iwaki, M., Kitagawa. T., Akamatsu. Y., Aibara K. 1990. Cytotoxic effects of aflatoxin B1 by several forms of purified cytochrome P-450. **Mutat. Res.** 174: 85-88.

Jassar, B. S., Singh B. 1993. Biochemical changes in experimental aflatoxicosis in broiler chicken. **Indian J. Anim. Sci.** 63: 847-848.

Jernigan, M. A., Miles R. D., Arafla A. S. 1985. Probiotics in poultry nutrition a review. **W. Poult. Sci. Assoc.** 41: 99-108.

Kiessling, K. H., 1986. Biochemical mechanism of action of mycotoxins. **Pur. Appl.Chem.** 58: 327-388.

Kichou, F., Wasler M. M. 1994. Effects of aflatoxin B1 on chicken chondrocytes in culture. **Avian Dis.** 38: 11-15.

Klaassen, C. D., Rozman K. 1991. Absortion, distribution and excretion of toxicants, en Amdur, M. O., Doull, J. y Klaassen, C. D. (Eds). **Casarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons**, 4th ed 50-87.

Kligerman, A. D., Erexon G. L., Willner J. L. 1985. Induction of sister chromatid exchange (SCE) and cell cycle inhibition in mouse peripheral blood B lymphocytes exposed to mutagenic and carcinogens *in vivo*. **Mutat. res.** 157: 181-187.

Kmet, V., Flint H. J., Wallace R. J. 1993. Probiotics and manipulation of rumen development and function. **Reviw. Arch. Anim. Nutr.** 44: 1-10.

Knudson, A. G. 1985. Hereditary cancer, oncogenes and antioncogenes. **Cancer Res.** 45: 1437.

- Kockova, Kratochvilova A. 1990. Yeast and yeast like organism. **VCH Publisher**, New York USA : 123–126, 156–166.
- Kubena, L. F., Harvey R. B., Huff N. E., Corrier D. E. 1989. Ameliorating properties of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on the toxicity of aflatoxin and T-2 Toxin. Abstracts of the 7th annual meeting of the Poultry Science Association. **Poult. Sci.** 68: 69–72.
- Kubena, L. F., Harvey N. E., Phillips T. D., Clement A. B. 1993. Effect of hidrated sodium calcium aluminosilicate on aflatoxicosis in broiler chickens. **Poult. Sci.** :72:651–653.
- Kumar, A., Dingle J. 1995. Effect or brewers yeast on broiler performance. **Proc. Of Nutr. Soc. Aust.** 1: 175–176.
- Lafont, P., Siriwardana M. G., Lafont J. 1989. Genotoxicity of hydroxy–aflatoxins M1 and M4. **Micro. Alim. Nutr.** 7: 1–8.
- Lake, B. G., Beamand J. A., Weild P. T., Price R. J. 1996. Use of precision–cut liver splices to evaluate species differences in 2-acetylan-dnofluoreno-induced unscheduled DNA synthesis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 138: 231–241.
- Langouet, S., Coles B., Morel F., Becquemont L., Beaune P., Guengerich F., Katterer B., Guillouzo A. 1995. Inhibition of CYP1A2 and CYP3A4 by oltipraz results in reduction of aflatoxin B1 metabolism in human hepatocytes in primary culture. **Cancer. Res.** 55: 5574–5579.
- Lanza, G. M., Washburn K. W., Waytt R. D. 1980. Strain variation in hematological response of broilers to dietary aflatoxin. **Poult. Sci.** 58: 1439–1440.
- Latt, S. A. 1981. Sister chromatid exchanges: a report of the genotox program. **Mutat. Res.** 87: 17–62.
- Leeson, S., Díaz G., Summers J. 1995. **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins.** Edit. University Books, Guelph, Canadá: 249–298.
- Lewis, C. W., Smith J.E., Anderson. J. G., Freshney. R. I. 1999. Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines *in vitro* via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay. **Mycopathologia** 148: 97–102.
- Lillehøj, E. B. 1987. The aflatoxin in maize problem: The historical prespective. **Aflatoxin in Maize.** Ed. CINAMYT, México: 13–27.

Lim-Sylianc, C., Sylianco W. L. 1992. Antigenotoxic effects of B vitamins. **Asean Food J.** 7: 100-104.

Lindermann, M. D., Blodgett E.T., Kornegay E. T., Schuring G.G.1993. Potential ameliorators of aflatoxicosis in weanlinggrwin swine. **J. Anim. Sci.** 71: 171-178.

Liu, D., Yao. D., Liang. Y., Zhou. T., Song. Y., Zhao. L. y Ma. L. 2001. Production, purification and characterization of an intracellular aflatoxin-detoxifizyme from *Armillariella tabescens*. **Food Chem Toxicol.** 39: 461-466.

López, L. C. y Christensen C. M. 1967. Effect of Moisture content and temperature on invasion of stored corn by *Aspergillus flavus* -**Phytopat**-57: 588-590.

Loury, D.J. 1995. The effect of enzyme induction on the genotoxicity and metabolism mutagens/carcinogens in primary hepatocytes cultures. **Dissert Abs. Int.** 45: 2514.

Lyon, T. 1995. Biotechnology in the feed industry en. **Proc. Alltech¹⁰th Annual Symposium on Biotechnology in the feed Industry.** Nottingham University Press. 1: 48.

March, 1979. The host and its microflora an ecological unit. **J. Anim. Sci.** 49: 3.

McDaniel, G. R. 1991. Effect of Yea-Sacc¹⁰²⁶ on reproductive performance of broiler breeder males and females. **The 7th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed industry.** Alltech Inc., Lexington Kentucky: 12-17.

McGlynn, K, A., Rosvold. E. A., Lustbader. E. D., Hu Ying., Clapper. M. L., Zhou. T., W. Ch.P., Xia. X-ling., Bonnie. A. B., Adjel. D. O., Chen. G.Ch., London W. T., Shen. Fu. M. Buetow. K. 1995. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 92; 2384-2387.

Mc Gregor, J., Wehr C., Henika, P., Shelby, M. 1990. The *in vivo* erythrocytes micronucleus test: Measurement at steady state increase assay efficiency and permits integration with toxicity studies. **Fundam. Appl. Toxicol.** 14: 513-527.

Macoco, P. C. 1994. Contenido de micotoxinas en cereales para alimento de animales. **Tesis de Lic. Biología.** Facultad de Ciencias. UNAM, México: 12-38.

Madle, E., Korte A., Beek Bernd. 1986. Species differences in mutagenicity testing: micronucleus, and SCE test in rat, mice, and chinese hamsters with aflatoxin B1. **Terat. Carcin. And Mutagen.** 6: 1-13.

Manoj, K. B., Devegowda G. 2000. Efficacy of esterified glucomannan to ameliorate the toxic effects of T-2 toxin in Laying hens. **XXI World's Poultry Congress**. Canada: 62.

Major, J., Kemony G., Tompa A. 1993. Genotoxic effects of occupational exposure in the peripheral blood lymphocytes of pesticide preparing workers in Hungary. **Act. Med. Hung.** 49: 79-90.

Márquez, M. R., Madrigal B. E., Tejada de H. I. 1993. Genotoxic evaluation of ammonium inactivated aflatoxin B1 in mice fed with contaminated corn. **Mutat. Res.** 299: 1-18

Márquez, M. R., Quintana M. A. y Tejada de H. I. 1994. Evaluación de un probiótico en pollos de engorda en: **Memorias de la Reunión. Nacional. de Investigación. Pecuaria. en México:** 45.

Márquez, M. R., Martínez A. A., Tejada de H. I., Weismerheimer R. J. 1995 Irradiación con Co 60 de maíz contaminado con aflatoxina B1 en: **Memorias de la Reunión Nacional de Investigación Pecuaria en México:** 288.

Márquez, M. R., Tejada de H. I., Madrigal B. E. 1995. Genotoxicity aflatoxin B1 and its ammonium derivatives. **Food Addit. and Contam.** 12: 425-429.

Márquez, M. R., Tejada de H. I. 1995. Aflatoxin adsorbent capacity of two Mexican aluminosilicates in experimentally contaminated chickens diets. **Food Addit. Contam.** 12: 431-433.

Martínez, L. H. 1992. Evaluación nutricional de una levadura cultivada en metanol (*Pichia-sp*) (NRRL 11430) para la alimentación de aves. **Tesis de M. en C., FES-Cuautitlán, UNAM, México:** 25-34.

Merkley, J. W., Maxwell, R. J., Phillips J. G., Huff W. E. 1987. Hepatic fatty acid profiles in aflatoxin-exposed broiler chickens. **Poult. Sci.** 66: 59-67.

Meselson, M., Russel G. 1977. Comparison of carcinogenic and mutagenic potency, en Hiatt, H., Watson J. D. y Winsten J. A. (eds). **Origin of Human Cancer, Cold Spring Harbor conference**, New York: 1473-1483.

Miller, J. D. 1992. Productions of Mycotoxins. **VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.** México: 104-106.

Mistry, K. J., Krishna M., Pasupathy K., Muthy V., Bhrattacharya. 1996. Signal transduction mechanism in response to aflatoxin 131 exposure: protein kinase C activity. **Chem. Biol. Interact.** 100: 177-185.

Moreno, E. M. 1983. Conservación de granos almacenados. **Memorias del coloquio Internacional sobre la conservación de semillas y granos almacenados.** Instituto de Biología de la UNAM, México: 412-434.

Morita, T. Takeda K., Okumura K. 1990. Evaluation of clastogenicity of formic acid, acetic acid and lactic acid on cultured mammalian Cells. **Mutat. Res.** 240: 195-202.

Mpofu, I. D., Ndlovu L. R. 1994. The potential of yeast and natural fungi for enhancing fibre digestibility of forages and roughages. **Anim. Feed. Sci. Technol.** 48: 39-47.

Mueller, K., Kasper P., Mueller L. 1993. An assessment of the in vitro hepatocyte micronucleus assay. **Mutat. Res.** 292: 213-224.

Newbold C. J., Wallace R. J., McIntosh F. M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. **Br. J. Nutr.** 76: 249-253.

Newman, K. 1995. Mannan oligosaccharides and animal nutrition. **Proc. Alltech's 9th Annual Asia Pacific Lecture** : 55-60.

Nisbet, D. J., Martin S. A. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. **J. Anim. Sci.** 69: 4628-4631.

Niels, W. 1982. Yeast cell envelopes: biochemistry, biophysics and ultrastructure. **CRC Press. Inc. Boca Raton, Florida USA.** Vol 1 pp 66-79.

NRC. 1978. **Nutrient requirements of laboratory animals.** National Academic of Science, USA. Vol 3 pp 338-53.

Obioha W.I., Stahr H. M. y Kraft A.A. 1986. Distribution and effects of aflatoxins in chicken Tissues after feeding radiolabelled (¹⁴C) aflatoxin B1. **J. Food Protec.** 198: 259-267.

Ortiz A.C. 1992. **Manual de procedimientos para el análisis de aflatoxinas.** Eds. Centro Nacional de Investigación Científica y Capacitación, ANDSA, Dirección de Capacitación: 211-219.

Osborne, D. J., Huff W. E., Hamilton P. B., Burtmeister H. R. 1982. Comparison of ochratoxin, aflatoxin, and T-2 toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific metabolism of carotenoids in chickens. **Poult. Sci.** : 1646-1652.

Osweiler, G. D., Carson T. L., Buck W. B., Van Gelder G. A. 1985. **Clinical and Diagnostic. Vet. Toxic.** 3^a. ed. Kendall-Hunt, Iowa: 409-450.

Park, J. M., Son S. W., Jean Y. H., Cho J. H., Rhee C. J., Cho T. H., Namgoong S., Park K. S. 1989. Detoxification of aflatoxin in corn using ammonia and yeast. **Res. Rep. Rural. Devel. Admin. Vet.** 31: 49-53.

Park D. L. 1993. Controlling aflatoxin in food and feed. **Food Technol. Oct.** 1993: 92-96.

Park D. L. 1993. Perspectives in mycotoxin decontamination procedures. **Food Addit. Contam.** 10: 49-60.

Park D. L., Liang. 1993 Perspectives on aflatoxin control for human food and animal feed. **Food Sci Technol.** 4: 334-342.

Parker, R.B. 1986. Probiotics, the other half of the antibiotics history. **Biotech '86.** San Francisco Ca. USA: 12-17.

Patterson, D. S. P. 1973. Metabolism a factor in determining the toxic action of the aflatoxins in different animal species. **Fd. Cosmet. Toxicol.** 11: 287-294.

Patterson D. S. P., Roberts B. A. 1970. The formation of the aflatoxin B₂ and G_{2a} and their degradation products during the in vitro detoxification of aflatoxin by liver of certain avian and mammalian species. **Fd. Cosmet. Toxicol.** 8: 527-538.

PeñaBetancourt, S. D., Suarez M.M. 1992. Estudio de los niveles de micotoxinas presentes en semillas oleaginosas. **VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins.** México: 177-178

Perdigon, G., DeMacias N., Alvarez S., Oliver G., Deriuz H. 1986. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infect. Immunol** 33: 404-410.

Pereira, M. A. 1982. Mouse skin bioassay for chemical carcinogens: **J. Am. Coll. Toxicol.** 1: 47- 82.

Petr, T., Barta L., Adamkova M., Hrabal P., Bartova J. 1991. The effect of partial hepatectomy on the genotoxicity of aflatoxins B₁. **Neopl.** 38: 77-83.

Phillips, T. D., Beverly A. C., Sarr A. B. 1992. **VIII International IUPAC Symposium on Mycotoxins and phycotoxins.** México. 151-153.

Pier, A. C., Richard J. L., Cysewski S. J. 1980. Implications of mycotoxins in animal disease. **J. Av. Ma.** 8: 719-724.

Pier, A. C. 1987. Aflatoxicosis and immunosuppression in mammalian animal, en: **Aflatoxin in Maize**, Ed. M. S. Zuber, E. Liuehdjj y B. L. Renfro México, CIMMYT: 58-65.

Pier, A. C. 1992. Major Biological consequences of aflatoxicosis in animal production. **J. Anim. Sci.** 70: 3964-3967

Pino, R. J. 1996. Efecto de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* en el desarrollo de becerros prerrumiantes. **Tesis de M en C.**, Colegio de Posgraduados, Instituto de Enseñanza en Ciencias Agrícolas, Chapingo, México: 25-45.

Pollmann, D., Danielson D., Poe E. 1980. Effect of *Lactobacillus acidophilus* on starter pigs fed a diet supplemented with lactose. **J. Anim. Sci.** 51: 638-643.

Pozzi, C. R., Correa. B., Xavier J. G., Direito G. M., Orsi R. B., Matarazzo. 2000. Effects Of prolonged oral administration of fumonisin B1 and aflatoxin B1 in rat. **Mycopathologia.** 151: 21-27.

Raney, K. D., Gopalakrishnan, S. A., Byrd, S. Y., Stone, M. P., Harris, T. M. 1990. Alteration of the aflatoxin cyclopentanone ring to a delta-lactone reduces intercalation with DNA and decreases formation of guanine N7 adducts by aflatoxin epoxides. **Chem.Res. Toxicol.** 3: 254- 261.

Raju, M. V. L. N. Y Devegowda G. 2000. Efficacy of esterified glucomannan on organ weights, serum biochemical and hematological profile in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis of aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin. **XXI World's Poultry Congress.** Canada. 20-24.

Razo, V. R. 1995. Probióticos. 44 Congreso Nacional de Química, Mazatlán Sinaloa. **Rev. Química de México.** 39: 261.

Reiss, E. 1987. Cell wall composition. **Biochemical structure of microorganism.** Publishers USA: 57-70.

Renner, H. W., Munzner R. 1991. The possible role of ptobiotics as diety antimutagens. **Matat. Res.** 262: 239-245.

Rigger, J. 1991. **Glossary of genetics classical and molecular**. Ed. Springer verlag Germany: 339-345.

Robb, J. 1993. Mycotoxins: contamination and decontamination. **Feed. Mix.** 1: 18-23.

Robbins, L. S., Cotran R. S., Kumar V. 1997. **Patología Estructural y funcional**. Ed. McGraw-Hill Interamericana. 5ª ed. México. Pp 271-338.

Rodricks, J. V., Messeltine C. W., Mehlam H. A. 1977. **Mycotoxins in human and animal health**. Ed Pathotox Publishers Inc. USA: 37-47.

Rodriguez, N. A. 1977. Comisión Nacional de la Industria del Maíz para consumo humano. **La industria del maíz**, México: 15-32.

Rogers, C. G., Boyes B. G., Lok T. 1990. Comparative genotoxicity of 3 procarcinogens in V79 cell as related to glutathione S-transferase activity of hepatocytes from untreated rats and those fed 2% butylated hydroxianisole. **Matat. Res.** 244: 163-171.

Roland, D. 1993. Evidence for absorption of silicon and aluminum by hens fed sodium zeolite. **Poult. Sci.** 72: 391-396.

Rompelberg, C. J., Evertz S. J., Bruijnties-Rozier G. C., Vanden Heuvel P. D., Verhagen H. 1996. Effect of eugenol on the genotoxicity of established mutagens in the liver. **Food Chem. Toxicol.** 34: 33-42.

Rojas, V., Puga C., Espinosa G. T 1992. Estudio comparativo de la presencia de *Aspergillus flavus* y de aflatoxinas en nueve variedades de maíz (zea-mays). **VIII International IUOAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins**. México: 175-176.

Rhose, A. H. 1987. Yeast culture a microorganism for all species; a theoretical look at its mode of action. **III Anual alltech's Symposium**. Lexington, Kentucky USA: 17-21.

Rossi, F., Cocwhitcelli P. y Masoero. F. 1995. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and lactate utilization by ruminal bacterium *Megasphora elsofnii*. **Ann Zootech.** 44: 403-406.

Rosiles M. R. 1997. Fumonisin en animales domésticos. **II Coloquio Internacional sobre Micotoxinas**, México: 32.

Salamanca, F. 1993. **Citogenética humana**. Ed Médica Panamericana. 2ª reimpresión. México. 86-89, 219-226, 258-268, 291, 368-377, 391.

- Salomone, F., Mavournin H. 1994. Bone marrow micronucleus assay: A review of the mouse stocks, used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. **Environ. Mol. Mutagen.** 23: 237-273
- Sakai, M., Abe K., Okumura H., Sugiura Y., Horie H., Ueno Y. 1992. Genotoxicity of fungi evaluated by SOS microplate assay. **Nat. Toxins.** 1: 27-32.
- Sargeant, K. A., O'Kelly J. S., Carnaghan 1961. Toxicity associated with certain samples of groundnuts. **Nat.** 192: 1219-1223.
- Sarwar, G., Shah B. G., Mongeau R., Hopner K. 1985. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **J. food Sci.** 50: 353-357.
- Sawhney, D. S., Vadehra D. V., Baker R. C. 1973. The metabolism of 14 C aflatoxins in laying hens. **Poult. Sci.** 52: 1302-1309.
- Serrano, G. L., Montero M. R. 2001. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. **Environmental. Molecular. Mutagenesis.** 38: 38-45.
- Sharma, Yash. P., Sumbali G. 1999. Incidence of aflatoxin producing strains and aflatoxin Contamination in dry fruit slices of quinces(*cydonia oblonga* mill) from the Indian State of Jammu and Kashmir. **Mycopathologia** 148: 103-107.
- Schelgel, R., MacGregor J. T. 1982. The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes, detection of chronic chromosome breakage in mice. **Mutat. Res.** 113: 481-487.
- Schelgel, R., MacGregor J. T. 1983. A rapid screen for cumulative chromosomal damage in mice, accumulation of circulating micronucleated erythrocytes. **Mutat. Res.** 113: 314-316
- Schimid, W. 1975. The micronucleus test. **Mutat. Res.** 31: 9-15.
- Siegel, S., Castellan Jr. N. J. 1988. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences.** 2a Ed. McGraw-Hill Book Co. Singapore: 87-96.
- Smela, M. E., Currier S. S., Bailey E.A., Essigmann J. M. 2001. The chemistry and biology of aflatoxin B1: from mutational spectrometry to carcinogenesis. **Carcinogenesis.** 22: 535-545.
- Smith, J. E. y Ross K. 1991. The toxigenic Aspergill, en: Smith, J. E., Henderson, R. S. (ed.), **Mycotoxins and Animal Food.** Boca Raton, CRC Press:101-118.

Stanley, V. G., Ojo R., Woldesenbet S., Hutchinson D. H. 1993. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chickens. **Poult. Sci.** 72: 1867-1872.

Stanley, V. G., Brown C., Sefton A. E. 2000. Comparative evaluation of yeast culture, mannanoligosaccharide and an antibiotic on performance of turkey. **XXI World's Poultry Congress**. Canada: 117.

Stewart, C. S., Gilmour J., MacConveille M. L. 1986. Microbial interactions, manipulation and genetic engineering in agriculture. New development and future perspectives in research of rumen function. **A Neiman-Sørensen Commission of the European Communities**: 243-257.

Styles, J. A., Richardson C. R., Burlison B. 1983. A comparison of the incidence of micronuclei in blood and bone marrow in 3 strains of mouse dosed with cyclophosphamide or hexamethylphosphamide (HMPA). **Mutat. Res.** 122: 143-147.

Suzuky, Y., Shimizu H., Nagae Y., Fukumoto M., Okonogi H., Kaduckura M. 1993. Micro Nucleus test and erythropoiesis; effect of cobalt on the induction of micronuclei mutagens. **Environ. Mol. Mutagen.** 22: 101 - 106.

Takahashi, T. 1993. Distribution and characteristic of aflatoxin-production by some indian strains of *Aspergillus flavus*. **Indian J. Micro.** 32: 327-332.

Takaji, I. 1989. Sce enigma: methodology, mechanism and meaning of sister chromatid exchange. **Annu. Rep. Res.** 22: 57-77.

Technical Dossier Yea-Sacc¹⁰²⁶. 1998. Ed. Allthec Inc. Nicholasville, Kentucky, USA, 40356: 1-31.

Tejada, de H. I. 1983. **Manual de análisis de ingredientes para la alimentación animal**. Ed. PAIEPEME, México: 3640.

Thompson, M., McInnes, R. 1996. **Genética en Medicina**. Ed. Masson. 4^a ed. España: pp 351- 354.

Torreblanca, R. A., Bourges H. R., Morales J. A. 1987. Aflatoxin in maize and tortillas in México. **Aflatoxin in Maize**, ed. CIMMYT, México: 310-316.

Truckess, M. 1977. Immunochemical Methods for mycotoxins in foods. **Memorias del II Simposium Latinoamericano de micotoxinas**. México: 23.

- Tseng, T. H., Chu C. Y., Wang C. J. 1992. Inhibition of penta-acetyl geniposide on AFB1 induced genotoxicity in C 3111 OTI/2 cell. **Cane. Lett.** 62: 233-242.
- Tseng, T. H., Chu C. Y., Wang C. J. 1994. Comparison of geniposide and its acetylated derivatives for the inhibition of aflatoxin B1 induced DNA repair synthesis in rat primary hepatocyte. **Oncol. Rep.** 1: 165-168.
- Tung, H. T., Cook F. W., Waytt R. D., Hamilton P. B. 1975. The anemia caused by aflatoxin. **Poult. Sci.** 54:1962-1969.
- Ueno, Y., Tashiro F., Harikawa K. 1984. Metabolism and their toxicity, en Tazima Y. et al. (Ed.). **Problems of treshold in chemical mutagenesis.**The environmental mutafen Society of Japan: 61-71.
- Vaghef, H., Hellman B. 1995. Demostration of chlorobenzene-induced DNA damage in mouse lymphocytes using the single cell electrophoresis assay. **Toxicol.** 90: 19-28.
- VanEgmond, H. P. 2001. Aflatoxin M1. **National Institute of Public Healt and the Environment.** Laboratory for Residue Analysis:17-18
- Wallace, R. J. 1994. Ruminant n-ficrobiology,biotechnology and ruminant nutrition: progress and problems. **J. Anim. Sci.** 72: 2992-3003.
- Wallace, R. J. 1998. Yeasts benefits examined. **Feed. Mix.** 6: 27-28.
- Walli, T. K. 1994. Role of yeast culture in rumen ecosystem and animal performance. **J. Anim. Sci.** 9: 117-121.
- Wang, J. S., Huang T., Su J., Liang F., Wei Z. Liang Y., Huang S. Y., Qian G. S., Sun G., He X., Kensier. T. W. 2001. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village country, Fusui country, People's Republic of china. **Cancer epidemiol biomarker prev.** 10: 143-146.
- Weidmeier, R. D., Arambel M. J., Walters J. L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. **J. Dairy. Sci.** 70: 2063-2068
- Weinberg, R. A. 1989. The molecular basis of multistep carcinogenesis in shell strength. **Poult Sci.** 64: 1302- 1305.

Williams, P. E., Macdeamid A., Imes G., Brewer A. 1983. Turnips with chemically treated straw for beef production. 2 effects of turnips on the degradability of straw in the rumen. **Anim. Prod.** 37: 189-194.

Williams, D., Di Luzio N. 1985. Immunopharmacologic modification of experimental viral disease by glucan. **Immunopharmacol.** 5: 78-82.

Wilson, A. S., Tingle M. D., Kelly M. D., Park B. K. 1995. Evaluation of the generation of genotoxic and cytotoxic metabolites of benzopyrene, aflatoxin B1, naphthalene and tamoxifen using human liver microsomes and human lymphocytes. **Hum. Exp. Toxicol.** 14: 507-515.

Wogan, G. A. 1977. Mode of action of aflatoxins. **Mycotoxin in human and animal health.** Pathotox Publishers Inc. USA: 29-50.

Wolf, H. A., Jackson E. W. 1963. Hepatomas in rainbow trout description and experimental epidemiology. **Sci.** 142: 676-678.

Yoshikawa H., Uchimaru R., Kato R. y Ueno Y. 1982. Metabolism and activation of aflatoxin B1 by reconstituted cytochrome P-450 sistem of rat liver. **Cancer Res.** 42: 1120-1124.