



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación de la efectividad del uso de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* en bovinos que consumieron alimento contaminado con Zearalenona

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

PRESENTA:

SAÚL ESCOBEDO AGUIRRE

ASESOR: Dra. María del Carmen Espejel del Moral

COASESOR: Dr. Juan Carlos Del Río García

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación de la efectividad del uso de paredes celulares de Saccharomyces cerevisiae en bovinos que consumieron alimento contaminado con Zearalenona

Que presenta el pasante: SAÚL ESCOBEDO AGUIRRE

Con número de cuenta: 30705193-0 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de enero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.V.Z. Ruperto Javier Hernández Balderas	
VOCAL	M.V.Z. Blanca Rosa Moreno Cardenti	
SECRETARIO	Dra. María del Carmen Espejel Del Moral	
1er. SUPLENTE	M. en C. Juan Carlos Valladares De la Cruz	
2do. SUPLENTE	M. en M.V.Z. Héctor Reyes Soto	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

Agradecimientos

Agradezco a todos los que me ayudaron desde el inicio de este trabajo, incluyendo a trabajadores, estudiantes, profesores, familiares y no menos importantes, los semovientes (Bovinos) que formaron parte del proyecto.

De manera particular deseo agradecer:

A mis directores de tesis, Mary y Juan Carlos, por el tiempo que me brindaron, la confianza que me regalaron, el conocimiento que mostraron y la pasión que hoy siento por la universidad.

A Michele por acompañarme a lo largo de este camino con su ayuda, con su apoyo, con sus ánimos, y gracias por el camino que aún falta por recorrer.

A Marisol, quién guía el camino con su luz, esmero, inteligencia y extroversión. ¡Sigue así! Voy detrás de ti.

A mis padres, Lucía y Saúl, el más grande agradecimiento. Les debo todo lo que conozco y lo que soy. Gracias por su amable comprensión, empeño, apoyo económico y emocional, confianza y por supuesto, su amor.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a los proyectos PAPIIT IA204917 y PIAPI 1649, por financiar el presente proyecto.

Agradecimientos

Agradezco a todos los que me ayudaron desde el inicio de este trabajo, incluyendo a trabajadores, estudiantes, profesores, familiares y no menos importantes, los semovientes (Bovinos) que formaron parte del proyecto.

De manera particular deseo agradecer:

A mis directores de tesis, Mary y Juan Carlos, por el tiempo que me brindaron, la confianza que me regalaron, el conocimiento que mostraron y la pasión que hoy siento por la universidad.

A Michele por acompañarme a lo largo de este camino con su ayuda, con su apoyo, con sus ánimos, y gracias por el camino que aún falta por recorrer.

A Marisol, quién guía el camino con su luz, esmero, inteligencia y extroversión. ¡Sigue así! Voy detrás de ti.

A mis padres, Lucía y Saúl, el más grande agradecimiento. Les debo todo lo que conozco y lo que soy. Gracias por su amable comprensión, empeño, apoyo económico y emocional, confianza y por supuesto, su amor.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a los proyectos PAPIIT IA204917 y PIAPI 1649, por financiar el presente proyecto.

Índice	Pág.
1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
2.1 Hongos relacionados con la alimentación animal	4
2.2 Micotoxinas	7
2.3 Toxicidad de las micotoxinas	8
2.4 Zearalenona y sus metabolitos α -Zearalenol y β -Zearalenol	10
2.5 Medidas de control de las micotoxinas en sistemas de producción de alimento	16
2.6 Métodos de control de las micotoxinas en alimentos para consumo	17
2.7 Paredes celulares de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
3.- Justificación	20
4.- Hipótesis	21
5.- Objetivo general	21
6.- Objetivos específicos	21
7.- Materiales y métodos	21
8.- Resultados	24
9.- Discusión	26
10.- Conclusiones	29
11.- Referencias bibliográficas	30

Índice de tablas y figuras	Pág.
Figura 1.- Producción lechera total en diferentes estados de la República Mexicana en el año 2015	2
Figura 2.- Maíz invadido por un hongo del género <i>Fusarium spp.</i>	6
Figura 3.- ZEA, α -Zearalenol y β -Zearalenol	11
Figura 4.- Mecanismo de acción de la Zearalenona	12
Figura 5.- Días de tratamiento y días de colección de muestras	23
Tabla 1.- Géneros y especies de hongos productores de micotoxinas	7
Tabla 2.- Los principales efectos tóxicos de las micotoxinas	9
Tabla 3.- Distribución de tratamientos	24
Tabla 4.- Concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol en suero al inicio del trabajo experimental (día 1).	25
Tabla 5.- Concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol en suero después de 10 días de tratamiento	26

Resumen

La Zearalenona (ZEA) es una micotoxina estrogénica no esterooidal producida por varias especies de hongos del género *Fusarium*. Esta micotoxina y sus metabolitos α -Zearalenol y β -Zearalenol, pueden causar problemas reproductivos. Existen componentes que previenen la absorción de algunas micotoxinas al unirse a éstas para ser eliminadas junto con las heces. El objetivo de este estudio fue evaluar la efectividad de un preparado a base paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la adsorción de ZEA, α -Zearalenol y β -Zearalenol al medir su concentración en suero de sangre de vacas lecheras alimentadas por 10 días con alimento contaminado con ZEA; la cuantificación se realizó a través de HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia). Fueron veinticuatro vacas divididas en cuatro grupos: El grupo 1 (Neg) no recibió ZEA ni paredes celulares; el grupo 2 (ZPos) recibió ZEA (1000mg/kg de peso vivo) sin paredes celulares; el grupo 3 (ZPC10) recibió ZEA (1000mg/kg) y paredes celulares (10g/vaca/día); el grupo 4 (ZPC20) recibieron ZEA (1000mg/kg) y paredes celulares (20g/vaca/día). Se tomaron muestras de sangre los días 1 y 10 del experimento, los datos fueron expresados a través de una conversión logarítmica. Los grupos Neg (0.76 ± 0.09) y ZPC10 (0.97 ± 0.05) mostraron valores similares de ZEA, los cuales son menores que en el grupo ZPos (1.35 ± 0.18) ($P < 0.05$); en contraste, ZPC20 (1.09 ± 0.06) no tuvo diferencia significativa de los otros grupos. Con respecto a α -Zearalenol, los valores del grupo ZPC10 (1.02 ± 0.06) fueron diferentes ($P < 0.05$) de las vacas que no recibieron paredes celulares (Neg= 0.62 ± 0.09 ; ZPos= 1.35 ± 0.18). Respecto a β -Zearalenol, los valores obtenidos de ZPC 10 (0.83 ± 0.03) mostraron diferencia ($P < 0.05$) en los grupos ZPos (1.11 ± 0.12) y el grupo Neg (0.39 ± 0.09); en contraste, el grupo ZPC20 (0.89 ± 0.07) no presentó diferencia significativa con los grupos ZPos y ZPC10, pero sí con el grupo Neg. El uso de 10g/vaca/día de paredes celulares a base de *Saccharomyces cerevisiae* disminuye las concentraciones séricas de ZEA, α -Zearalenol y β -Zearalenol, lo cual puede reducir el riesgo de que se presenten desórdenes reproductivos en vacas.

Introducción

La producción lechera en México se extiende en la mayoría de su territorio. Los estados con mayor producción fueron Jalisco, Coahuila, Durango y Chihuahua, durante los años 2005 a 2010, que aportaron conjuntamente el 45% de la producción nacional en este período (Lactodata, 2017).

En la gráfica 1 se observa la producción lechera total del año 2015, se nota que continúa concentrándose en los estados mencionados. Entre 2010 y 2015 la producción láctea ha aumentado, donde Chihuahua produjo 934,928 miles de litros en el año 2010, para el 2015 su producción se elevó hasta 1,034,227. En el caso de Jalisco, en 2010 produjo 1,960,999 de litros y para 2015 su producción alcanzó 2,157,002 (SIAP, 2017).

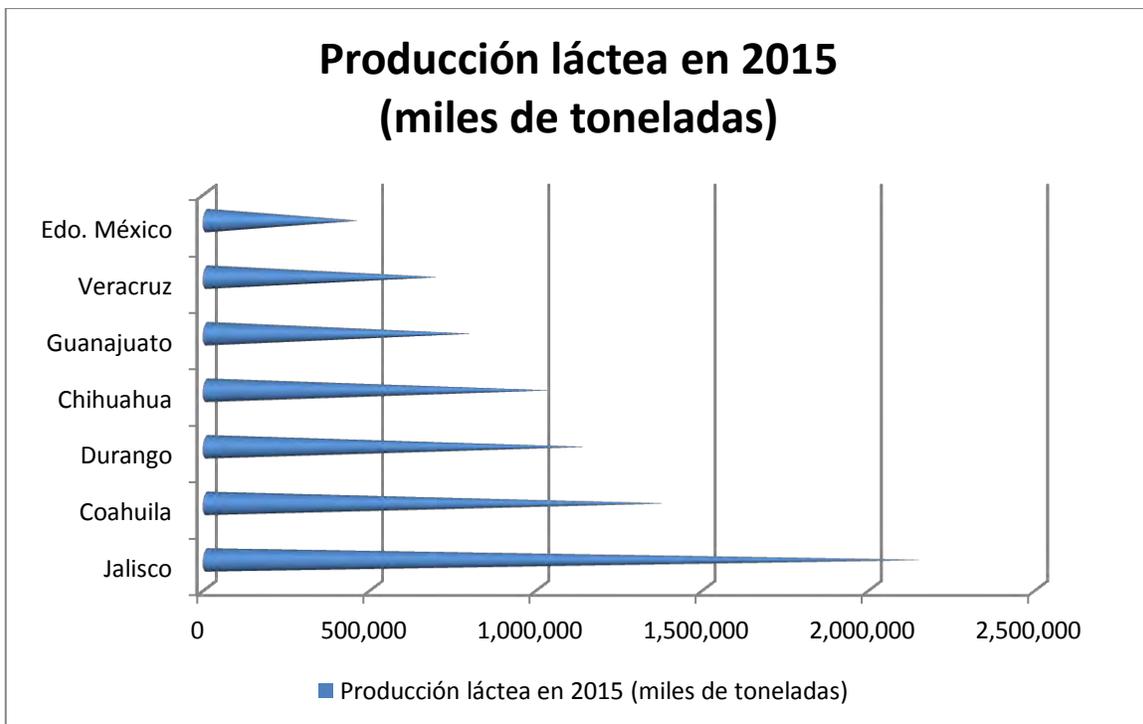


Figura 1.- Producción lechera total en diferentes estados de la República Mexicana en el año 2015 (Adaptado de SIAP).

La producción de leche en México ha ido en aumento año con año. En el 2010 la producción fue de 10,676,691 y en el año 2016 de 11,607,493, incluso durante el

cuarto trimestre de 2016 se obtuvo un crecimiento del 1.9% con respecto al mismo periodo de 2015, es decir, la producción aumentó 212, 830 miles de litros (SIAP, 2017). Sin embargo, a pesar del crecimiento productivo, el abasto es insuficiente por lo que es necesario importar leche para abastecer la demanda de la misma. En el año 2006 la cifra de importación fue de 143 mil 529 toneladas, mientras que para 2016 la importación aumentó el 104% con 292 mil 803 toneladas. Aunado a esto, si consideramos que el INEGI durante el censo del 2010, arrojó la cifra de 112,336,538 habitantes en el país y la CONAPO estima un incremento en la población de 150,837,516 en el año 2030, sitúa al país en una posición difícil para satisfacer las necesidades de la población por lo que se tienen que establecer las medidas necesarias para mejorar el desempeño productivo de los sistemas de producción lecheros (FEMELECHE, 2017).

Los factores que limitan a la producción de leche en cantidad y calidad adecuada son diversos, entre ellos las enfermedades como ciertos tipos de micotoxicosis que afectan el metabolismo del animal o eliminando micotoxinas a través de la secreción láctea (Patriarca y Fernández, 2017). Las micotoxinas, responsables de causar micotoxicosis, son metabolitos químicos tóxicos producidos por hongos presentes en granos, forrajes y ensilados en general (Zinedine *et al.*, 2007; Diaz, 2010; Bezerra *et al.*, 2014). Las micotoxicosis son enfermedades que representan una amenaza importante para la sanidad animal, limitando en consecuencia la producción de alimentos de origen animal como huevo, carne o leche (Patriarca y Fernández, 2017), pero además pueden afectar la salud humana causando diversos padecimientos inmunosupresión, vértigo, dolor esofágico, gastroenteritis, dificultad respiratoria, cáncer hepático e incluso la muerte (Zain, 2011).

Las Aflatoxinas, Zearalenona, Tricotecenos, Ocratoxina y Deoxinivalenol son las micotoxinas más importantes que afectan al ganado lechero. Cuando los animales las consume son absorbidas y distribuidas en el organismo, lesionando a diferentes órganos en dependencia del tipo de toxina (Espíndola, 2006). Algunas micotoxinas pueden afectar de manera aguda o crónica, causando inapetencia, letargia, hígado graso etc., al final conducen a la disminución de la producción

láctea (Whitlow y Hagler, 2004). Las micotoxinas llegan a la alimentación animal debido a un inadecuado control en los cultivos de alimento. De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2018), se estima que el 25% de los cultivos alimentarios mundiales, se ven afectados por hongos productores de micotoxinas. En el centro de Europa, países como Francia, Austria y Alemania, han encontrado el 90% de sus cultivos de cereales contaminados con micotoxinas (De Ruyck *et al.*, 2015). En un estudio realizado en México por Flores *et al.* (2006) encontró que el 57.0% de un total de 312 de alimentos (alimento balanceado, alimento ensilado, sorgo, maíz y subproductos de maíz) presentaron las siguientes micotoxinas como contaminante: Ocratoxina A, Fumonisinias, Toxina T2 y Zearalenona. Adicionalmente, el 11.2% de las muestras afectadas rebasó el límite permitido de las normas de regulación.

En la literatura se han descrito una amplia variedad de efectos clínicos atribuidos a los efectos de la Zearalenona ya que es una micotoxina estrogénica puede inducir efectos similares a los del 17-betaestradiol, por lo que representa un riesgo a la salud (Zinedine *et al.*, 2007). En consecuencia, la productividad de las vacas lecheras y las vaquillas puede verse alterada por la presencia de Zearalenona en los alimentos. Un tratamiento para ésta micotoxicosis se basa en la eliminación del alimento contaminado y su reemplazo por otros no contaminados, otro es utilizar compuestos que eviten la absorción de la Zearalenona, como son la paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (Espíndola, 2006; Zinedine *et al.*, 2007)

Hongos relacionados con la alimentación animal

Existen hongos filamentosos que crecen en los alimentos destinados para consumo animal, incluyendo forrajes y concentrados. Es importante señalar que algunos hongos pueden producir diferentes micotoxinas, por ejemplo, el género *Aspergillus* produce aflatoxinas, que son micotoxinas con gran potencial carcinogénico; *Fusarium* es capaz de producir una micotoxina estrogénica llamada Zearalenona (ZEA) (Moretti & Sarrocco, 2016).

El crecimiento de hongos presentes en los insumos destinados a la alimentación animal es una ocurrencia que se da tanto en el campo como durante la cosecha, el transporte y en el almacén de los alimentos (Diaz, 2010).

Los hongos se desarrollarán si están en condiciones óptimas (por ejemplo temperaturas entre los 20 y 30 °C, de 13 a 18% de humedad y por lo menos 1-2% de oxígeno), lo cual hace evidente su presencia de manera macroscópica, incluso sin haber producido micotoxinas. Las rutas metabólicas secundarias son la vía metabólica por la cual los hongos son capaces de producir micotoxinas, si las condiciones no favorecen al hongo, se hace necesario el uso de estas rutas, es decir, reacciones metabólicas que tienen lugar cuando el hongo no puede obtener energía de manera óptima a través de rutas metabólicas habituales (Whitlow & Hagler, 2004; Diaz, 2010).

La presencia de los hongos puede mermar el alimento al descomponerlo o bien, al producir micotoxinas que al encontrarse presente y ser consumido afectan a la salud humana o animal (Chelkowski, 1989; Zinedine *et al.*, 2007).

Los hongos que se relacionan con el alimento del ganado varían dependiendo del alimento, por ejemplo en ensilajes se puede encontrar *Aspergillus fumigatus* o *Penicillium*, sin embargo, si el ensilado tiene una entrada de aire, la probabilidad de encontrar hongos del género *Fusarium* es muy alta. En el caso de los henos, en condiciones invernales, se crea condensación de agua en la superficie, facilitando la proliferación de *Aspergillus fumigatus*. En cereales y sus productos es común encontrar hongos del género *Fusarium*, al igual que en los cultivos de pastos y maíz (Ramos, 2011).

Fusarium es un género de hongos que contiene varias especies saprófitas comunes del suelo, pero también patógenos para las plantas y es frecuentemente encontrado en granos (ver Figura 2). Muchas especies de *Fusarium* producen numerosos metabolitos secundarios que pueden causar respuestas fisiológicas en plantas (como la transformación de Deoxinivalenol y Zearalenona a compuestos sin factores de virulencia con la enzima Gluconiltransferasa, o la aparición de

blanqueamiento de espigas con semillas arrugadas) y animales (como hiperestrogenismo, peroxidación de lípidos, inhibición de síntesis de proteínas y material genético, etc.) como Fumonisin, Deoxinivalenol y Zearalenona (Chelkowski, 1989; Dweba *et al.* 2017).

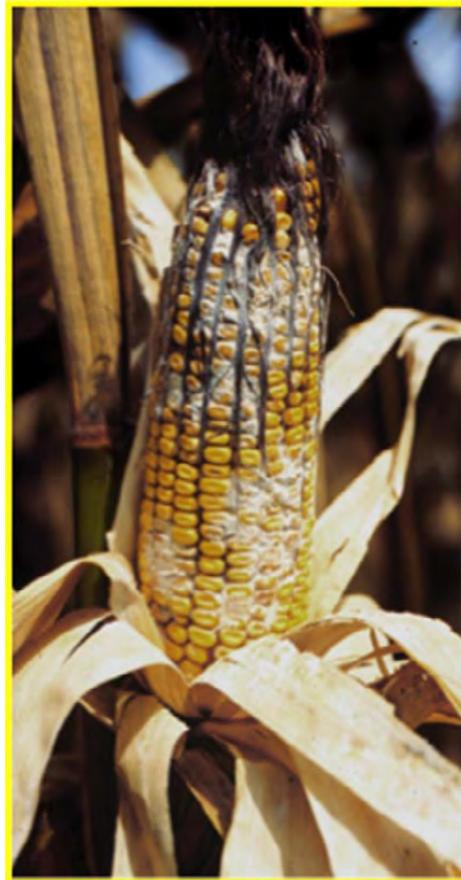


Figura 2. Maíz invadido por un hongo del género *Fusarium spp.* (Tomado de Moretti & Sarrocco, 2016).

Los hongos también pueden desarrollarse en el organismo de las vacas lecheras, principalmente durante periodos de estrés cuando hay inmunosupresión, pudiendo causar neumonías cuando la vía es aerógena, o por vía sanguínea al atravesar el epitelio ruminal lesionado como consecuencia de acidosis ruminal, afectando tanto el rumen como al hígado vía venas porta. Pero su manera de afección no se limita sólo a la infestación fúngica, si no a su capacidad de síntesis de micotoxinas (Tabla 1) (Whitlow y Hagler, 2004).

Tabla 1. Géneros y especies de hongos productores de micotoxinas (Tomado y modificado de Petersson *et al.*, 1998; Diaz, 2010; Ramos, 2011; Zain, 2011).

Género	Especie	Micotoxina
<i>Aspergillus</i>	<i>A. ochraceus</i>	Ocratoxina A
	<i>A. flavus</i>	Aflatoxinas
	<i>A. parasiticus</i>	Aflatoxinas
<i>Fusarium</i>	<i>F. proliferatum</i>	Fumonisinias
	<i>F. verticillioides</i>	Fumonisinias y Zearalenona
	<i>F. graminearum</i>	Deoxinivalenol y Zearalenona
	<i>F. roseum</i>	Zearalenona
<i>Penicillium</i>	<i>P. verrucosum</i>	Ocratoxina A
	<i>P. purpurescens</i>	Ocratoxina A

La presencia del hongo visible no es una prueba de la contaminación por micotoxinas. Mientras que la ausencia de hongos detectables macroscópicamente no significa que las toxinas estén ausentes, ya que el hongo puede estar presente o desaparecer después de producir micotoxinas (Jouany *et al.*, 2009).

Micotoxinas

Las micotoxinas son clasificadas como metabolitos secundarios de los hongos, lo que significa que su función no es esencial para la existencia del hongo. Si durante el desarrollo del hongo las condiciones no fueron favorables para este, por ejemplo, temperaturas de 30-37 °C (Cheli, *et al.*, 2013), será posible encontrar altos niveles de micotoxinas y no encontrar evidencia de crecimiento fúngico debido a que el hongo desarrolló micotoxinas al no poder crecer bajo condiciones óptimas (Acosta *et al.*, 2016). Esto se presenta cuando el hongo vive en condiciones adversas como sequías, cosecha o quema de campos que modifican su ambiente al limitar la disponibilidad de plantas y generar cambios de pH, temperatura y humedad (Whitlow y Hagler, 2004; Butkeraitis *et al.*, 2008; Jouany *et al.*, 2009).

Las micotoxinas pueden sintetizarse por los hongos, como ya se dijo, en el cultivo del campo o durante la cosecha, pero también durante el procesamiento, el almacenaje o la alimentación. El desarrollo y la formación de las micotoxinas en materias primas y alimentos dependen de determinadas características ambientales. Las aflatoxinas se producen en un rango de 12 a 40 °C, a un pH de 3.5-8 y con gran cantidad de Actividad del agua (A_w 0.996). El A_w es un parámetro que brinda la información sobre la cantidad de humedad que tienen los alimentos, lo cual determina su capacidad de conservación y de desarrollo de microorganismos (Tadapaneni *et al.*, 2017). Además de esto, el nitrógeno y los carbohidratos son factores nutricionales para la biosíntesis de aflatoxinas, sin embargo aún no es claro el mecanismo (Diaz, 2010). La Ocratoxina A se puede sintetizar de 12-37 °C, con un pH mínimo de 2.2 y A_w de 0.80 por hongos del género *Aspergillus* o bien a 4 °C y un A_w de 0.86 por el género *Penicillium* (Diaz, 2010). La Zearalenona es producida en altas cantidades cuando el A_w es de 0.94 hasta 0.97 y una temperatura entre 12-18 °C, siendo 15 °C la temperatura que más favorece su producción (Lahouar, *et al.*, 2017). Éstas afectan a los animales cuando consumen alimento contaminado con micotoxinas, causando problemas inmunitarios, reproductivos, oncogénicos, etc. Cuando existen estos u otros problemas como desarrollo mamario prepuberal, baja conversión alimenticia, vómito, diarrea, etc. (Withlow y Hagler, 2004).

Toxicidad de las micotoxinas

Las micotoxinas afectan al sector agropecuario en muchos países al contaminar el alimento destinado a animales, ya sea que limite su exportación o que afecte de manera directa la salud del animal, y en algunos casos el alimento destinado para consumo humano también es afectado (Bezerra *et al.*, 2014). Las micotoxinas afectan a los animales causando inmunosupresión, hepatotoxicidad, genotoxicidad, etc. Como se observa en la tabla 2 (Alonso *et al.*, 2002; Espíndola, 2006).

Tabla 2.-Los principales efectos tóxicos de las micotoxinas (Tomado y modificado de Alonso *et al.*, 2002; Espíndola, 2006; Jouany, *et al.*, 2009).

Toxina	Principal efecto
Zearalenona	Estrogénico
Tricotecenos y Ocratoxina A	Inmunotóxico
Aflatoxinas	Hepatotóxico
Ocratoxina A y Citrinina	Nefrotóxico
Aflatoxinas, Fumonisinias y Ocratoxina A	Cancerígeno
Aflatoxinas y Ocratoxina A	Teratogénico
Tricotecenos	Inhibición de síntesis de proteínas
Ocratoxina A, Aflatoxinas, Deoxinivalenol	Citotóxico

Las diversas micotoxinas causan diferentes alteraciones en los animales, por ejemplo, la Ocratoxina A y la Toxina T-2 (Tricotecenos) afectan inhibiendo la síntesis de proteína, ADN y ARN en las células, lo cual puede incurrir en anomalías genéticas que pueden traducirse en oncogénesis. Estas mismas toxinas, junto con las Aflatoxinas (AFB₁, AFG₁ y AFM₁), Fumonisinias (FUMB₁, FUMB₂ y FUMB₃), Deoxinivalenol (DON) y otras micotoxinas pueden estimular la peroxidación de lípidos en los tejidos blanco de cada micotoxina, causando lipidosis hepática, vómito y diarrea. Adicionalmente, la Toxina T-2 es capaz de inducir la muerte celular al inhibir la síntesis de proteínas y de esta manera la mitosis celular (Espíndola, 2006).

La micotoxina DON es causante de problemas digestivos como náusea y vómito. Cuando ésta es consumida por cerdos y otros animales, aún en dosis baja, puede causar el rechazo del alimento (Espíndola, 2006).

Tras el consumo de Aflatoxinas por los pollos, se ha observado un bajo peso corporal con un aumento en el peso de hígado y riñones (Kumar y Balachandran, 2009; Zain, 2011). El mecanismo de acción de las aflatoxinas involucra en su metabolismo intermediarios reactivos que se unen a macromoléculas, causando

así la interrupción de procesos de transcripción y traducción. De esta manera Kumar y Balachandran (2009) observaron en muestras histológicas de hígado de pollos de engorda que los hepatocitos presentaron vacuolas intracitoplasmáticas, hiperplasia de conductos biliares, congestión, fibrosis y arquitectura alterada formando un arreglo acinar después de alimentarlos con una mezcla de alimento iniciador con 1ppm (parte por millón) de Aflatoxinas.

Los tricotecenos (Toxina T-2) pueden causar letargia, bajo consumo de alimento, disminución de la temperatura corporal, hipertensión, taquicardia y por último la muerte en ratas. Su mecanismo de acción a nivel celular es la inhibición de la síntesis de proteína (Zain, 2011).

Se han asociado problemas reproductivos en animales que han consumo de la Zearalenona (Bezerra *et al.*, 2014).

Zearalenona y sus metabolitos α -Zearalenol y β -Zearalenol

La Zearalenona es una micotoxina estrogénica no esteroidea, conocida como micotoxina F-2 o ZEA. Es producida por varias especies de hongos pertenecientes al género *Fusarium* (*Fusarium graminearum*, *Fusarium roseum* y algunas cepas de *Fusarium verticilloides*) (Chelkowski, 1989; Zinedine *et al.*, 2007; Abassi *et al.*, 2016).

La Zearalenona ha sido encontrada de manera global en muestras de alimentos preparados a base de maíz, cebada, trigo y sorgo destinados al consumo animal (Zinedine *et al.*, 2007).

La Zearalenona tiene dos metabolitos, α - y β -Zearalenol, producto del metabolismo de la Zearalenona, las tres moléculas afectan negativamente a la reproducción debido a sus propiedades estrogénicas, dichos efectos se deben a su estructura química semejante al 17-betaestradiol. El α -Zearalenol es más estrogénicamente activa que la Zearalenona y β -Zearalenol, y ésta última es la que presenta menor capacidad estrogénica de las tres, ver figura 3 (Doerr, 2003; Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007; Zinedine *et al.*, 2007; Jouany *et al.*, 2009). El

α -Zearalenol y β -Zearalenol se presentan como las dos moléculas con la menor concentración sérica entre la Zearalenona y todos sus metabolitos secundarios, por lo que ha sido poco medida y estudiada (Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007).

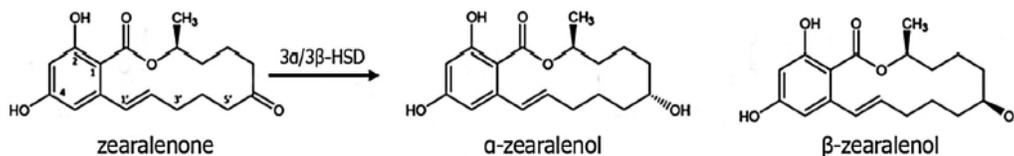


Figura 3. ZEA, α -Zearalenol y β -Zearalenol (Tomado y modificado de Kowalska *et al.*, 2016) 3 α /3 β -HSD refiriendo a 3 α - y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa.

Cuando la Zearalenona actúa sobre la glucosa de los granos, se determina la formación de una beta lactona del ácido resorcílico, con una marcada afinidad para los receptores celulares estrogénicos (17-betaestradiol), estos receptores están localizados en los núcleos de las células uterinas y hepáticas (Perusia y Rodríguez, 2001). Al parecer la Zearalenona sufre un doblez en su estructura que permite que el grupo hidroxilo se oriente adecuadamente y así facilitar el enlace con los receptores del 17-betaestradiol del individuo afectado (Espíndola, 2006).

Es conocido que la actividad de las hormonas esteroideas es medida por la unión no covalente de éstas al receptor específico que poseen las células en su interior. Esta unión (Zearalenona + receptor) es transportada a los núcleos celulares en donde interactúan con receptores reservados para la cromatina e inducir la transcripción selectiva del ARN. Esta hipótesis es la base para las demás interpretaciones de la acción de la Zearalenona. La unión de la Zearalenona a los receptores específicos de 17-betaestradiol, está relacionado a la estructura química de éstos (figura 4) (Perusia y Rodríguez, 2001).

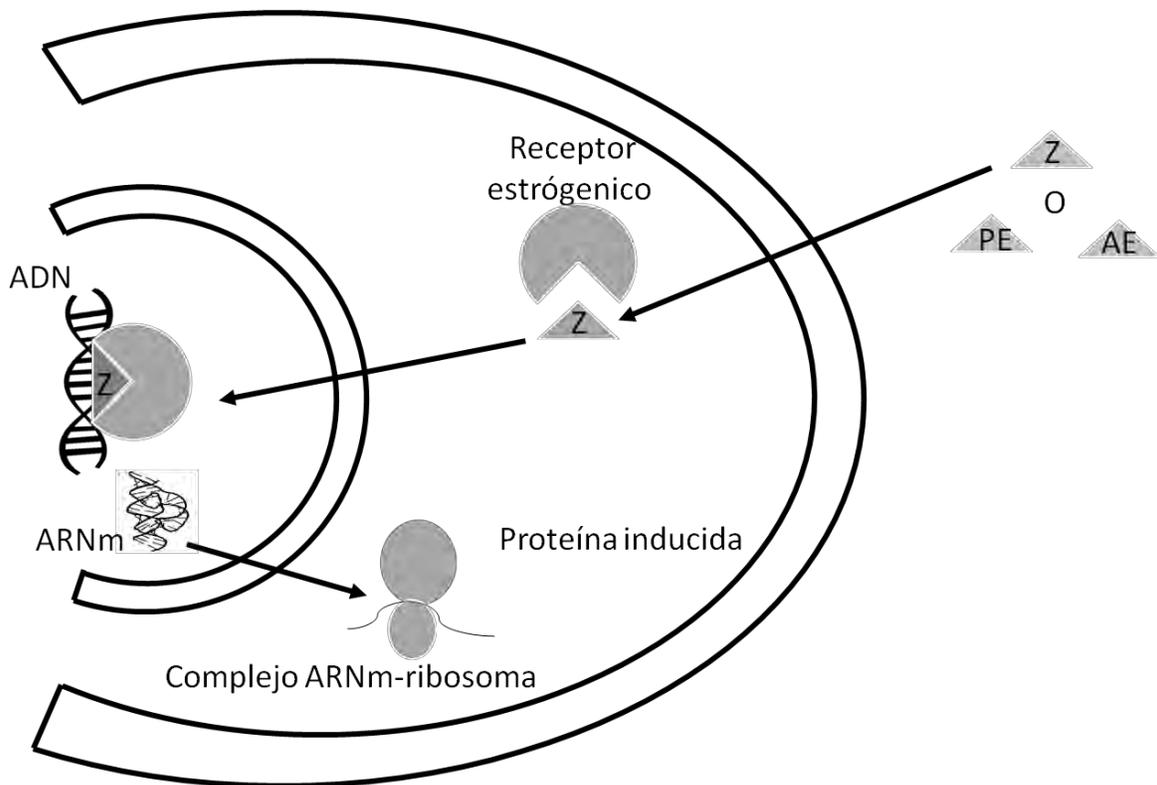


Figura 4.- Mecanismo de acción de la Zearalenona. La Zearalenona (Z) interactúa con el receptor estrógeno citosólico de manera parecida a la interacción con fitoestrógenos (PE) y estrógenos ambientales (AE) que atraviesan pasivamente la membrana celular para unirse al receptor mencionado. El complejo formado por receptor-Z (o bien el complejo unido a PE o AE) es transferido dentro del núcleo, donde se une al receptor específico nuclear para generar respuestas estrógenas vía activación de genes, teniendo como resultado la producción de ARNm's que codifican para la expresión proteínas que normalmente son respuesta de la unión del complejo receptor-estrógeno (Tomado y adaptado de Diaz, 2010).

Esta unión permite la formación de derivados (6'cetonas y 6' hidroxil) que compiten con los receptores del 17-betaestradiol; en otras palabras, existe una inhibición competitiva entre la Zearalenona y el 17-betaestradiol por los receptores específicos. Esto determina una acción mimética de la micotoxina con respecto a los estrógenos dentro del organismo animal (Perusia y Rodríguez, 2001).

Existen dos vías principales por las que se metaboliza la Zearalenona. La primera es la hidroxilación, donde resultan α -Zearalenol y β -Zearalenol tras la catalización con 3 α - y 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (ver figura 3). La otra vía es la conjugación de Zearalenona donde se reducen los metabolitos con ácido glucurónico (Zinedine *et al.*, 2007).

La Zearalenona es absorbida de manera rápida tras su ingestión en un 80% a un 85% de su totalidad. En suero de cerdos existen cantidades significativas de Zearalenona y sus metabolitos tras 30 minutos de haberse administrado el alimento contaminado; se estima que la vida media de eliminación del plasma es de 87 horas tanto en administración oral como intravenosa. La recirculación enterohepática tiene mucho que ver en esto, pues la bilis secretada durante la digestión de los alimentos es reabsorbida en un 80% momentos después de ser secretada. Se ha comprobado que la vida media se reduce a 3 horas tras haber ligado previamente el ducto biliar (Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007).

La biotransformación de Zearalenona se lleva principalmente en el intestino y en el hígado, pero también en los órganos blanco de actividad estrogénica. Existen dos fases metabólicas:

Durante la primera fase se reduce el grupo ceto en C-6 para dar lugar a α -Zearalenol y su isómero β -Zearalenol. Al reducirse una vez más, en el doble enlace C11-C12, se forma α -Zearalanol y β -Zearalanol, los cuales son poco fluorescentes y menos cuantificados. La reducción del grupo ceto es catalizada por 3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, presente en varios órganos y tejidos, responsable del metabolismo de hormonas esteroideas. La Zearalenona tiene la capacidad de competir con hormonas naturales en los sitios de unión del sustrato 3-alfa-hidroxiesteroide deshidrogenasa, pudiendo interferir con esteroides activos en tejidos ricos en receptores.

Tras la primera fase, α -Zearalenol y β -Zearalenol son conjugados por UDP-glucuronil transferasa para ser excretado por orina y sales biliares (Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007). La excreción a través de la leche es otra vía por la cual el rumiante elimina Zearalenona y sus metabolitos. Durante el paso de las micotoxinas de la sangre a la leche se involucran mecanismos como filtración intracelular, difusión pasiva a través de membranas celulares y transporte activo a través de excreción de vesículas. La Zearalenona y sus metabolitos pueden representar un riesgo para los consumidores de leche si ésta proviene de vacas con micotoxicosis (Jouany *et al.*, 2009).

A pesar de que no están esclarecidas las circunstancias o condiciones de la eficiencia de los organismos ruminales, la microbiota ruminal del bovino es capaz de asimilar y metabolizar micotoxinas. Sin embargo sólo una parte es transformada en compuestos sin capacidad estrogénica (Doerr, 2003).

La capacidad de degradar o metabolizar micotoxinas con la microbiota ruminal hace a los rumiantes menos susceptibles a padecer micotoxicosis. Una bacteria ruminal capaz de degradar a la Zearalenona *in vitro* es *Butyrivibrio fibrisolvens*, además de degradar Deoxivalenol y Ocratoxina A, la Zearalenona es rápidamente convertida en α -Zearalenol y en β -Zearalenol, atribuido también a la porción de protozoarios ruminales (Jouany *et al.*, 2009).

La Zearalenona y sus metabolitos, α -Zearalenol y β -Zearalenol, son responsables de ocasionar desórdenes reproductivos que impactan en la fertilidad debido al hiperestrogenismo que se presenta (trastornos en la ovulación, implantación y desarrollo fetal) en mamíferos (Zinedine *et al.*, 2007), principalmente α -Zearalenol que, como ya se dijo, es estrogénicamente más activa que la Zearalenona y el β -Zearalenol (Doerr, 2003; Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007; Zinedine *et al.*, 2007; Jouany *et al.*, 2009). Los efectos clínicos de la Zearalenona varían según la raza animal, la edad, y de las condiciones del medio ambiente como la temperatura, la humedad y el pH (Hooser & Witte, 2003). Mientras que la mayoría de los signos clínicos observados semeja la estimulación estrogénica en la actualidad no hay manera de determinar qué forma de síndrome se manifestará en un grupo afectado de animales (Butkeraitis *et al.*, 2008). En cerdas, se hallaron cambios en los genitales externos (vulva edematosa), en el ciclo estral (atrofia de ovario y útero, degeneración ovárica) y la fertilidad (abortos) (Zain, 2011 y Fleck *et al.*, 2017). Otros efectos encontrados en la cerda incluyen útero edematoso, quistes ováricos, disminución de fertilización con maduración folicular aumentada e incremento de número de nacidos muertos (Zain, 2011).

En ovejas se han reportado también desórdenes reproductivos, menor porcentaje de animales paridos e infertilidad asociado a Zearalenona. En esta especie, el primer signo observado es la reducción en la tasa de ovulación a una dosis de

0.03mg/kg administrado por 10 días. A dosis altas se observó un aumento en la duración del estro con aumento en el peso de útero y ovarios (Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007).

En un estudio realizado por Stinshoff *et al.* (2013), demostraron los efectos negativos de la exposición de Zearalenona en vacas lecheras sobre los parámetros reproductivos (como mayor número de días abiertos, baja fertilidad, absorción embrionaria y cambios en los niveles séricos de progesterona y estradiol), indican que independientemente de la edad del animal, la exposición a Zearalenona, puede provocar una alteración endocrina en este grupo de animales.

En novillas prepuberales, se ha observado que tras una alta exposición de Zearalenona, han desarrollado agrandamiento de glándulas mamarias y también se ha observado esterilidad (Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007). En novillas no prepuberales que se les administró 250mg cristalizados de Zearalenona, ha decrecido el rango de concepción (Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007).

El aumento en el número de días abiertos se debe a que cuando hay altas cantidades de estrógenos en el organismo animal, existe una retroalimentación negativa de la hormona folículo estimulante (FSH), con ello la maduración folicular se pueden ver afectadas y en consecuencia la ovulación; vacas con comportamiento estral sin relación al estro, similar al comportamiento normal durante la ovulación donde la vaca acepta y recibe al macho; vulva de mayor tamaño y agrandamiento de glándulas mamarias en vaquillas prepuberales debido a que los estrógenos son capaces de edematizar la vulva para la recepción del macho y también pueden estimular la formación de tejido mamario para la posterior producción láctea; la hiperplasia quística endometrial, es una condición donde aumentan el número de estructuras glandulares y estromales endometriales sin relación a gestación; la metaplasia escamosa, que conlleva al aumento del número de servicios por concepción al dificultar la implantación embrionaria, ocurre cuando el epitelio columnar simple, característico del endometrio, es estimulado por estrógenos de manera continua y crónica causando la reducción del tamaño de las células endometriales hacia un epitelio cuboide simple hasta la

conversión a un epitelio escamoso estratificado, modificando la morfología endometrial y con ello su función (Greaves, 2007; Zinedine *et al.* 2007; Jouany *et al.* 2009; Sobczuk y Sobczuk, 2017).

En ratones, ratas y cerdos de guinea se han observado muertes al consumir 2000-20000 mg/kg de Zearalenona (Zinedine *et al.*, 2007).

Aunque aun hacen falta estudios sobre el efecto de la Zearalenona en los humanos, se cree, que esta micotoxina actúa como una molécula estrogénica en los humanos, causando, por ende, problemas endócrinos cuando se presentan en una cantidad anormalmente alta (Kowalska *et al.*, 2016).

La difusión de la información sobre los efectos perjudiciales de la Zearalenona, y las medidas de prevención y control son la principal herramienta para combatir a la micotoxina y sus efectos negativos (Ramos, 2011).

Medidas de control de las micotoxinas en sistemas de producción de alimento

Para prevenir la contaminación de los alimentos con micotoxinas se realizan diferentes procedimientos, principalmente buenas prácticas agrícolas como seleccionar semillas resistentes al hongo; practicar la cosecha temprana, que consiste en cortar las plantas tiernas para evitar que las micotoxinas lleguen a sintetizarse; secado adecuado de henos para disminuir el agua disponible para el hongo; procesar el alimento por medio de tratamientos físicos como el descascarado, rolado, etc.; medidas básicas de saneamiento como remover los escombros de la cosecha anterior y limpieza de almacenes; almacenamiento apropiado con control de fauna nociva como insectos y ratas; y usar prácticas de cultivo como la rotación de campos, utilizar compuestos químicos y remover el alimento durante su almacenamiento, entre otros (Butkeraitis *et al.*, 2008; Doerr, 2003).

Altas concentraciones de ozono (O₃) se han utilizado para degradar y detoxificar el alimento, sin dejar Zearalenona detectable bajo cromatografía líquida, sin embargo

no hay información sobre los metabolitos. La cocción por extrusión es un proceso de corto tiempo y alta temperatura, que puede inactivar microorganismos y enzimas de productos alimenticios (Fellows, 2017), este método puede eliminar Zearalenona del alimento, sin embargo está encaminado a la inocuidad humana (Zinedine *et al.*, 2007).

Métodos de control de las micotoxinas en alimentos para consumo

Las medidas preventivas para evitar el desarrollo de los hongos son insuficientes cuando el ambiente provee condiciones favorables para el crecimiento de estos. Cuando el alimento está severamente contaminado se recomienda la destrucción y en menor grado de contaminación, será necesario tomar medidas de detoxificación para llevar el riesgo a un nivel mínimo (Ramos, 2011).

La detoxificación debe seguir un método que pueda destruir, remover o inactivar a las micotoxinas sin arriesgar la organoléptica o el valor nutritivo. Se clasifican en tres tipos: físicos, químicos y biológicos (Ramos, 2011).

Los métodos físicos van desde la selección de granos (granos pequeños, con cambios de coloración o con evidente crecimiento fúngico) para separar alimento contaminado del no contaminado, segregación de granos por densidad y flotación en medio acuoso (proceso donde los granos de maíz y trigo con Aflatoxinas, Deoxinivalenol y Zearalenona son identificados), hasta la inactivación térmica para alimentos que se procesan con alta temperatura (sin embargo existe el riesgo de producir metabolitos tóxicos o que la micotoxina sea termorresistente) y, la inactivación por radiación con diferentes energías como los rayos X, microondas, rayos ultravioleta y rayos gamma, siendo estos últimos los más efectivos, sin embargo a un alto costo (Ramos, 2011).

Los métodos químicos son poco usados debido a la reducción del valor nutricional o a la presencia de residuos tóxicos, algunos ejemplos de los químicos usados son el amoníaco, el formol, el cloro, el ozono y el hidróxido de calcio, sin embargo en la Unión Europea los métodos químicos para detoxificar micotoxinas están prohibidos debido a los residuos que pudieran afectar la salud (Ramos, 2011).

Existen compuestos que son administrados en la dieta de los animales como los aluminosilicatos, que han sido muy usados para adsorber diferentes micotoxinas, sin embargo son especialmente eficaces para captar Aflatoxinas (Ramos, 2011).

Los adsorbentes son sustancias inertes que permiten la unión de micotoxinas en su superficie fijándolas para su posterior salida en heces. De esta manera se evitan o reducen los efectos adversos en el organismo animal al impedir que la micotoxina sea absorbida por su organismo (Espíndola, 2006).

Los carbones activados o carbones activos son un grupo de sustancias, porosas e insolubles, que se obtienen por pirólisis en una atmósfera controlada de diferentes compuestos orgánicos como los residuos agroforestales. El tamaño de los poros, el área superficial y la presencia de funcionalidades químicas en su superficie son factores involucrados en la efectividad de este grupo. Su efectividad es menor a la mostrada por los aluminosilicatos (Ramos, 2011).

La colestiramina es una resina unida a ácidos biliares, ésta se confirmó como agente protector contra las micotoxinas y se informó que en conjunción con carbón activado pueden prevenir el hiperestrogenismo en cerdos causado por Zearalenona (Zinedine *et al.*, 2007; Ramos, 2011). El costo es muy alto, por lo que no es económicamente funcional. Se conoce desde hace cuatro décadas, que las levaduras como *Pichia anomala* y *Saccharomyces cerevisiae* presenta interacción con las micotoxinas (Zinedine *et al.*, 2007).

Otra manera de control es el uso métodos biológicos, como la detoxificación microbiana donde la presencia de un organismo controlador, o la acción de los compuestos químicos que produce, inhiben el crecimiento del hongo o la producción de sus micotoxinas. Sin embargo suelen producir cambios en el alimento como la fermentación (Ramos, 2011). Se ha hablado sobre la transformación de Zearalenona por hongos y actinomicetos (*Thamnidium elegans* y *Mucor bainieri*), donde la molécula resultante no es estrogénica. Dentro de los métodos biológicos se encuentran las paredes celulares (Zinedine *et al.*, 2007).

Paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*

Dentro de las estrategias para el control del efecto de la Zearalenona, se han utilizado suplementos alimenticios denominados como “secuestrantes”, “biotransformadores” o “compuestos protectores”. La utilización de paredes celulares de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) se ha convertido en una opción que limita la biodisponibilidad de las micotoxinas. Dicho compuesto celular está constituido de oligosacáridos, principalmente mananoligosacaridos (MOS) y β -glucanos. Se ha demostrado que las paredes de levaduras se unen a la Zearalenona y establecen una interacción y/o un enlace químico entre la molécula tóxica y los β -glucanos de su pared (Yiannikouris *et al.*, 2004; Maha *et al.*, 2012).

En un estudio *in vitro* con el material de la pared celular, los mananoligosacáridos modificados derivados de la célula de *Saccharomyces cerevisiae* 1026 mostraron una unión considerablemente alta a Zearalenona de aproximadamente el 80% (Zinedine *et al.*, 2007).

La eficacia de las paredes celulares de *S. cerevisiae* para adsorber Zearalenona ha sido comprobada de manera *in vitro* por diversos autores como Keller *et al.* (2015) y Armando *et al.* (2002).

En investigaciones *in vitro*, Keller *et al.* (2015) mencionan una adsorción de Zearalenona que va desde el 15 % hasta 26% en dependencia de la cepa usada. Además menciona que la absorción se da en las primeras 24 horas de administrarse la Zearalenona y declina durante los dos días siguientes.

Armando *et al.*, (2002) demostraron que la capacidad de adsorción de las paredes celulares varía en dependencia de la cantidad de micotoxina administrada y también de la cepa de *S. cerevisiae* utilizada. En una concentración baja de Zearalenona (1 a 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) la absorción va de 48 a 87%, mientras que en una concentración alta (20 a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) el rango de porcentaje de unión va de un 41.1 a 68.7%. Esto en condiciones *in vitro*.

Justificación

La Zearalenona es causante de problemas reproductivos en diferentes especies domésticas como cerdos y rumiantes (Hooser *et al.*, 2003, Wihtlow & Hagler, 2004, Espíndola, 2006; Ramos, 2011), por lo que es importante implementar programas de control y/o prevención, utilizando secuestrantes de micotoxinas. Un método de detoxificación efectivo debe cumplir con ciertas características como ser aceptado por las organizaciones regulatorias, ser económico, que pueda ser usado a gran escala y ser efectivo al usarse en un alimento contaminado con más de una micotoxina (Ramos, 2011). Una alternativa para los productores es el uso de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* gracias a que su precio no es elevado, a que es capaz de adsorber otras micotoxinas y no afecta de manera negativa el valor nutrimental de la ración alimenticia.

La investigación de capturantes de micotoxinas está en desarrollo, existen investigaciones *in vitro* que arrojan resultados de adsorción del 0% hasta valores próximos al 100% (Espíndola, 2006), pero los resultados varían en condiciones *in vivo*, por lo que es importante realizar investigaciones que se acerquen a la vida cotidiana de los animales dentro de los sistemas de producción.

No todos los adsorbentes utilizados son capaces de unirse a todas las micotoxinas, especialmente a Zearalenona debido a su estructura, incluso Bezerra *et al.* (2014) clasifican a la micotoxina de *Fusarium* (ZEA) como un micoestrógeno o como un estrógeno no esteroidal, sin embargo, las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* permiten su unión (Espíndola, 2006).

El costo de producción de leche debe minimizarse en todos los aspectos, por lo que el resultado del experimento al usar las dos dosis recomendadas de adsorbente será determinante en el costo del uso de este y por lo tanto de la producción. La dosis que el producto recomienda es de 10 a 20 gramos por vaca independiente al peso de cada animal y el costo del producto es de \$80 por kilogramo, por lo que cada kilogramo dosificara de 50 a 100 vacas por día. De esta manera la dosis de 20 gramos tiene un costo de \$1.6 pesos mexicanos y la dosis

de 10 gramos tiene un valor de \$0.80 centavos. Adicional al costo, los beneficios que brinda el adsorbente en una explotación lechera incluyen la disminución de problemas reproductivos, con ello una mayor cantidad de leche producida al año y libre de Zearalenona.

Hipótesis

La adición de un producto a base de paredes celulares en una dieta contaminada con una dosis conocida de Zearalenona, disminuirá la concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol séricos en bovinos.

Objetivo General

Evaluar la efectividad de un producto comercial hecho a base de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando dos concentraciones diferentes (10 ó 20g/animal/día), mediante la cuantificación de la concentración de Zearalenona y sus metabolitos en suero en bovinos desafiados con una concentración conocida de Zearalenona.

Objetivos Específicos

Cuantificar la concentración sérica de Zearalenona y sus metabolitos en bovinos alimentados con una dieta que contiene una dosis conocida de Zearalenona con y sin la adición de paredes celulares en la dieta.

Evaluar la capacidad de captura de Zearalenona que se encuentra en el alimento a dos concentraciones por día por animal de la pared de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, a través de la evaluación de la concentración sérica de Zearalenona y sus metabolitos.

Materiales y Métodos

El proyecto se realizó en un hato lechero comercial del Estado de México con un sistema de producción intensivo, en el laboratorio 14 "Alimentos, Micotoxinas y Micotoxicosis" de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria-FESC y en el Laboratorio PSP Calidad.

Materiales

Los materiales utilizados fueron:

- Ropa de trabajo: overoles, botas de hule, gafas protectoras y guantes de látex.
- Para la alimentación se usó: una báscula granataria, 24 comederos individuales, bolsas pequeñas de polietileno, palas de mano, 600kg de alimento concentrado comercial para engorda (15 costales) y 400kg de sorgo contaminado (10 costales). 1.8g de sorgo por cada kilo de peso vivo.
- Para la recolección de muestras se utilizaron: 110 tubos de ensayo para venopunción (Vacutainer) sin anticoagulante, camisas Vacutainer, 120 agujas para Vacutainer, plumones indelebles, una hielera, guantes para palpación y toallas de papel absorbente.

Material de laboratorio requirió: Centrífuga, pipetas, frascos, congelador.

Animales: Se utilizaron 24 hembras bovinas (20 vacas y 4 becerras) de la raza Holstein.

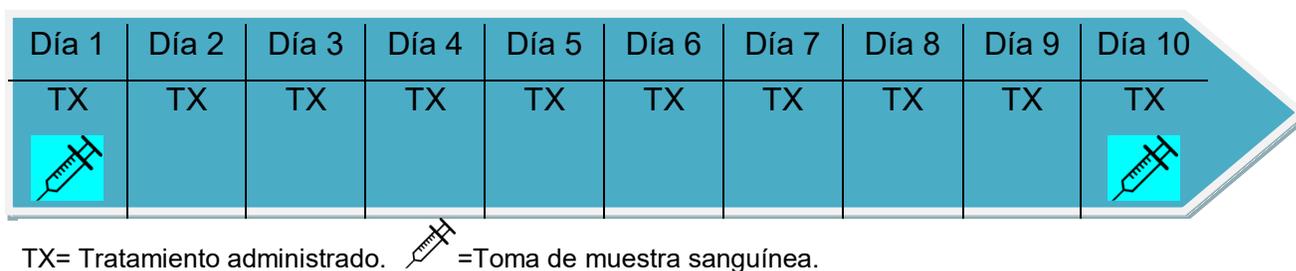
Metodología

Se utilizaron 20 vacas y 4 becerras a las que se les realizó una exploración clínica general, se revisó su tarjeta reproductiva para contar con animales diagnosticados clínicamente sanos, no gestantes y que no estuvieran en producción láctea. Los animales fueron asignados aleatoriamente en cada uno de los siguientes tratamientos: grupo 1 (Neg), grupo 2 (ZPos), grupo 3 (ZPC10) y grupo 4 (ZPC20). Cada grupo quedó integrado por 5 vacas y una becerro que fueron alojadas en corrales independientes por grupo.

Siete días antes de iniciar el experimento los animales, previamente separados, se sometieron a un periodo de adaptación en donde recibieron la dieta habitual. Antes de administrar los tratamientos se tomó una muestra del alimento heno para cuantificar la cantidad presente de Zearalenona.

Al inicio del experimento, el día 1, se tomó una muestra de sangre por cada animal, para después comenzar con la administración de los tratamientos. Los tratamientos se administraron con el concentrado diariamente de manera individual durante un periodo de 10 días. El grupo 1 (Neg) no recibió Zearalenona ni paredes celulares, los grupos 2 (ZPos), 3 (ZPC10) y 4 (ZPC20) recibieron 1000mg/Kg/PO de Zearalenona debido a que la contaminación natural de los alimentos en el continente americano oscila alrededor de esta cifra (Zinedine, 2007). Además de la dosis de Zearalenona las paredes celulares fueron administradas solamente en el grupo 3 (ZPC10) 10g/vaca/día y 4 (ZPC20) 20g/vaca/día. En el día 10 del experimento se volvió a coleccionar una muestra de sangre de cada animal (Figura 5).

Fig. 5.- Días de tratamiento y días de colección de muestras.



Las muestras de sangre del día 1 y 10 fueron llevadas al laboratorio 14 de la Unidad de Investigaciones Multidisciplinaria de la FES-C para la separación del suero, su congelación y envío al laboratorio PSP Calidad ubicado en Tehuacán Puebla para la cuantificación de la concentración sérica de Zearalenona y sus metabolitos (α -Zearalenol y β -Zearalenol) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Diseño Experimental

Los animales se asignaron aleatoriamente en uno de los cuatro tratamientos, quedando 5 vacas y 1 beceras por grupo (Tabla 3).

Tabla 3.- Distribución de tratamientos.

Tratamientos	Número de animales	Número de días del tratamiento	Concentración de ZEA en el alimento (mg/Kg de concentrado)	Adsorbente PC (g/animal/día)
1.- Neg	6	10	<50	0 g
2.- ZPos	6	10	1000	0 g
3.- ZPC10	6	10	1000	10 g
4.- ZPC20	6	10	1000	20 g

Neg (Negativo), ZPos (positivo), PC (Paredes celulares)

La cantidad de < 50 mg/kg concentrado, se refiere a la concentración que el alimento contenía previo al ajuste de las 1000 mg/kg de concentrado.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó haciendo previamente una transformación logarítmica Arco-Seno de los valores para que tuvieran un comportamiento normalizado. Se realizó un ANOVA de una vía con el paquete estadístico de Statgraphics 5.1 plus. Para la comparación de medias se utilizó la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) con un valor de significancia de $p < 0.05$.

Resultados

Antes de administrar los tratamientos se tomó una muestra del alimento henificado para cuantificar la cantidad presente de Zearalenona, encontrando en promedio $200 \mu\text{g}/\text{kg}$. Se tomó una muestra de sangre a cada animal de todos los grupos y se cuantificó serológicamente la concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol el día 1 y el día 10 de tratamiento. El grupo 1 (Neg) recibió alimento concentrado comercial sin añadir Zearalenona ni paredes celulares; el grupo 2 (ZPos), además de recibir alimento concentrado comercial, se le adicionó Zearalenona sin añadir tratamiento con paredes celulares; al grupo 3 (ZPC10) y al

grupo 4 (ZPC20) se les administró Zearalenona y tratamiento de paredes celulares, el grupo 3 (ZPC10) recibió 10g/animal/día y el grupo 4 (ZPC20) recibió 20g/animal/día.

Resultados serológicos del día 1 del experimento

En los cuatro grupos (tabla 4) se detectó la presencia de concentraciones séricas de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol antes de proporcionar las dietas contaminadas, sin diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

Tabla 4.- Concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol en suero al inicio del trabajo experimental (día 1).

Tratamientos	Número de animales	ZeaLog $\mu\text{g/l}$	α -ZeaLog $\mu\text{g/l}$	β -ZeaLog $\mu\text{g/l}$
1.- Neg	6	0.77 +/- 0.05	0.63 +/- 0.11	0.96 +/- 0.09
2.- ZPos	6	0.63 +/- 0.15	0.45 +/- 0.15	1.05 +/- 0.18
3.- ZPC10	6	0.64 +/- 0.03	0.30 +/- 0.0	0.97 +/- 0.05
4.- ZPC20	6	0.60 +/- 0.0	0.56 +/- .018	1.09 +/- 0.06

- ZeaLog (conversión logarítmica de los valores de ZEA), α -ZeaLog (conversión logarítmica de los valores de α -Zearalenol), β -zeaLog (conversión logarítmica de los valores de β -Zearalenol) aplicar esto a la otra tabla
- Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística ($p < 0.05$)
- Los valores mostrados en la tabla corresponden a la transformación logarítmica de las concentraciones en suero.

Resultados serológicos del día 10 del experimento

Después de 10 días de proporcionar un alimento con Zearalenona se observó cambios en la concentración sérica de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol presente en suero (tabla 5).

La diferencia estadística significativa ($p > 0.05$) al día 10 del experimento entre el grupo 1 (Neg), el cual no recibió Zearalenona ni adsorbente, y los grupos 3 (ZPC10) y 4 (ZPC20), a los cuales se les suministró la micotoxina y levaduras, es evidente al mostrar similitud en las concentraciones séricas encontradas al hablar de Zearalenona. En el caso de α -Zearalenol hay diferencia significativa con los grupos 3 (ZPC10) y 4 (ZPC20) al presentar concentraciones séricas iguales (1.02 +/- 0.06). Es conveniente notar que las concentraciones séricas más altas de

Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol corresponden al grupo 2 (ZPos) el cual recibió Zearalenona sin la administración del adsorbente. Lo cual muestra un efecto benéfico al usar el adsorbente a base de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* independientemente de la concentración utilizada.

Tabla 5.- Concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol en suero después de 10 días de tratamiento.

Tratamientos	Número de animales	ZeaLog $\mu\text{g/l}$	α -ZeaLog $\mu\text{g/l}$	β -ZeaLog $\mu\text{g/l}$
1.- Neg	6	0.76 +/- 0.09 a	0.62 +/- 0.09 a	0.39 +/- 0.09 a
2.- ZPos	6	1.35 +/- 0.18 b	1.35 +/- 0.03 c	1.11 +/- 0.12 c
3.- ZPC10	6	0.97 +/- 0.05 a	1.02 +/- 0.06 b	0.83 +/- 0.03 b
4.- ZPC20	6	1.09 +/- 0.06 ab	1.02 +/- 0.06 b	0.89 +/- 0.07 bc

- ZeaLog (conversión logarítmica de los valores de ZEA), α -ZeaLog (conversión logarítmica de los valores de α -Zearalenol), β -zeaLog (conversión logarítmica de los valores de β -Zearalenol) aplicar esto a la otra tabla
- Literales diferentes en cada columna indican diferencia estadística significativa.
- Los valores mostrados en la tabla corresponden a la transformación logarítmica de las concentraciones en suero.

Discusión

Los resultados del día 1 (Tabla 4.- Concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol en suero al inicio del trabajo experimental, pág. 25) donde existen concentraciones de Zearalenona y sus metabolitos (α -Zearalenol y β -Zearalenol) previo a la administración de la micotoxina se debe probablemente a que el forraje de ensilado de maíz contenía ciertas cantidades de Zearalenona. A pesar del uso la técnica de ELISA para determinar la contaminación del alimento que habitualmente se les administra, no se encontró contaminación, pero se hallaron en promedio 200 $\mu\text{g/kg}$ de Zearalenona en diversos alimentos como henificado y ensilado (técnica de análisis columnas de inmunoafinidad marca VICAM). La explicación del resultado falso negativo arrojado por la técnica de ELISA es que la matriz de los materiales analizados interrumpe la interacción entre antígeno anticuerpo, esto puede llegar a presentar subestimación de la presencia de la Zearalenona, a pesar de que el límite de detección para Zearalenona con la técnica de ELISA es de 0.1 a 100 $\mu\text{g/ml}$ (Thongrussamee *et al.*, 2008; Pei *et al.*,

2013) además de presentar reacciones cruzadas con otras micotoxinas como Aflatoxina B1 y Deoxinivalenol, Tricotecenos, Citrinina, Ocratoxina A, y Patulina (Thongrussamee *et al.*, 2008; Pei *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2017).

Estos niveles de Zearalenona han sido descritos como concentraciones comunes en campo por diversos autores. Zinedine (2007) reporta rangos que van desde 0.21µg/kg hasta 26.5mg/kg en granos y henificados a nivel mundial. Fink-Gremmels y Malekinejad (2007) mencionan la contaminación que existe en todos los continentes, promediando 276µg/kg en alimentos destinados al consumo animal como cereales y pasturas. Son pocos los estudios encontrados en México, García y Heredia (2006) hallaron una concentración que va de 1.36 a 2.04 µg/kg en trigo y maíz almacenado en el estado de Nayarit, sin embargo, no existen datos sobre los henificados en varios estados del país, incluyendo el Estado de México.

El resultado de la tabla 5 (Concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol en suero después de 10 días de consumo de alimento con Zearalenona y adsorbente, pág. 26) también ha sido reportado por otros investigadores (Wihtlow, & Hagler, 2004; Fink-Gremmels y Malekinejad, 2007 y Jouany *et al.*, 2009), al observar un aumento en la concentración en suero de metabolitos secundarios de Zearalenona a los 7 y 10 días de ingestión de la micotoxina.

No se han reportado experimentos que cuantifiquen la Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol en suero de sangre de bovinos como en este experimento, por lo que los resultados en otros proyectos con vacas lecheras son incomparables con los resultados arrojados en el presente experimento.

El alimento que reciben las vacas habitualmente puede estar altamente contaminado con Zearalenona y otras micotoxinas; en este experimento se midió el contenido de Zearalenona únicamente el primer día. Es común que el alimento destinado para animales contenga más de una micotoxina capaz de unirse con las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*. El funcionamiento y eficacia de las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* para adsorber micotoxinas

depende de la cantidad de agua y pH del medio donde se encuentre. Lo anteriormente mencionado, son factores que pueden modificar la capacidad de adsorbencia de las paredes de la levadura, lo que explica la posible razón por la cual el resultado de la tabla 5 no marca una diferencia significativa entre los grupos 3 (ZPC10) y 4 (ZPC20); de esta manera una condición subclínica de acidosis ruminal; una mayor cantidad de Zearalenona administrada en el alimento habitual durante el experimento; o bien, más de una micotoxina involucrada pudieron modificar la eficiencia de absorción de las paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*. El medir diariamente el contenido de micotoxinas del alimento habitual hubiera ayudado a conocer, tanto los niveles de Zearalenona presentes en el alimento como la presencia de otras micotoxinas de cada día para controlar el nivel de contaminación administrado.

Un estudio realizado por Keller *et al.* (2015) donde se midió la capacidad de adsorber Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol con el uso de tres cepas diferentes de *Saccharomyces cerevisiae*, arrojó como resultado un rango de adsorbencia de Zearalenona del 15% al 25%, para α -Zearalenol de 28% y sólo un 11% para β -Zearalenol. En los resultados de tabla 5 (pág. 26) se puede observar un comportamiento similar en las concentraciones séricas de Zearalenona y sus metabolitos al presentar una adsorbencia baja en β -Zearalenol (grupo 3y 4) y relativamente alta en Zearalenona y α -Zearalenol. La cantidad de α -Zearalenol adsorbida puede deberse a que la cepa utilizada durante el experimento no es la misma usada por Keller *et al.* (2015) además de la variación que existe al no poder proporcionar las medidas de laboratorio usadas en experimentos *in vitro*.

Conclusiones

La adición de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* en una dieta contaminada con una dosis conocida de Zearalenona, disminuye la concentración de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol séricos en bovinos.

El uso de 10 g/día/vaca de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* es suficiente para disminuir la concentración sérica de Zearalenona, α -Zearalenol y β -Zearalenol.

Referencias bibliográficas

Abassi, H., Ayed-Boussema, I., Shirley, S., Abid, S., Bacha, H. & Micheau, O. (2016) The mycotoxin zearalenone enchanges cell proliferation, colony formation and promotes cell migration in the human colon carcinoma cell line HCT116. *Toxicology Letters*, 254. pp. 1-7.

Acosta, Y., Mieres, J. & Manna A. (2016). Micotoxinas en alimentos para el ganado: alternativas para la mitigación de efectos adversos y criterios para la utilización más segura de alimentos contaminados. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina. pp. 1-4.

Alonso, A. J., González, J. R. & Rejas, J. (2002). Micotoxinas en rumiantes. Un problema pasado o presente. Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna Veterinaria. España. pp. 66-81.

Armando, M.R., Pizzolitto, R.P., Dogi, C.A., Cristofolini, A., Merkis, C., Poloni, V., Dalcero, A. M. & Cavaglieri, L. R. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology* ISSN. pp. 1364-5072.

Bezerra, M.E., Oliveria, F. C., Feitosa, F.E., Florindo, M. I & Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food control*, 36. pp. 159-165.

Butkeraitis, P., dos Santos, I. & Rodríguez, J. (2008). El efecto de las micotoxinas en rumiantes. *Süd-Chemie de México S.A. de C.V.* V, 3. pp. 1-4.

Cheli, F., Campagnoli, A. & Dell'Orto, V. (2013). Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 183. pp. 1-16.

Chelkowski, J. (1989). *Fusarium*. Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity. 2^a ed. Elsevier. Netherlands. pp. 1-38.

De Ruyck, K., De Boevre, M., Huybrechts, I & De Saeger, S. (2015). Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogénesis in humans: Short review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 766. pp. 32-41.

Dweba, C.C., Figlan, S., Shimelis, H. A., Motaung, T.E., Sydenham, S., Mwadzingeni, L. & Tsilo, T. J. (2017). Fusarium Head Blight of wheat: Pathogenesis and control strategies. *Crop Protection*, 91. pp. 114-122.

Diaz, D.E. (2010). *The Mycotoxin Blue Book*. EU. Nottingham University Press. pp. 9-295.

Doerr, J.A. (2003). Effects of Mycotoxins on Ruminant Bacteria and Animal Performance. College of Agriculture and Natural Resources, University of Maryland. pp. 30-31.

Espíndola, S. (2006). MICOTOXINAS Y MICOTOXICOSIS EN EL GANADO BOVINO LECHERO. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. pp. 89-94.

FAO. (2018). Food safety and quality: Micotoxicosis. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma. Recuperado de <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/mycotoxins/es/>

Fellows, P.J. (2017). Extrusion cooking. *Food Processing Technology* 4^a ed. pp. 753-780.

Fink-Gremmels, J. & Malekinejad, H. (2007). Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogenic zearalenone. *Animal Feed Science and Technology*, 137. pp. 326-341.

Fleck, S. C., Churchwell, M. I. & Doerge D. R. (2017). Metabolism and pharmacokinetics of zearalenone following oral and intravenous administration in juvenile female pigs. *Food and Chemical Toxicology*, 106. pp. 193-201.

Flores, C. M., Hernández, L. B. & Vázquez, J. (2006). Contaminación con micotoxinas en alimento balanceado y granos de uso pecuario en México en el

año 2003. Micotoxinas en el alimento y granos de uso pecuario, 44 (2). pp. 247-256.

García, S. & Heredia, N. (2006). Mycotoxins in Mexico: Epidemiology, management, and control strategies. *Mycopathologia*, 162. pp. 255-264.

Greaves, P. (2007). *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies 3th ed. Interpretation and Relevance in Drug Safety Evaluation*, pp. 717-779.

Hooser, S. & Witte, C. (2003). The presence, effect, and diagnosis of zearalenone in dairy cattle. Indiana. Recuperado de <https://www.addl.purdue.edu/newsletters/2003/winter/zearalonenone.shtml>

Infosiap. (2010-2015). Avance por Estado. México. Recuperado de http://infosiap.siap.gob.mx/repoAvance_siap_gb/pecAvanceEdo.jsp

Jouany, J.P., Yiannikouris, A. & Bertin G. (2009). Risk assessment of mycotoxins in ruminants and ruminant products. *Options Méditerranéennes*, 85. pp. 205-224.

Keller, L., Abrunhosa, L., Keller, K., Rosa, C. A., Cavaglieri, L. & Venançio, A. (2015). Zearalenone and Its Derivates α -Zearalenol and β -Zearalenol Decontamination by *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Bovine Forage. *Toxins*, 7. pp. 3297-3308.

Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D.E. & Piasdtowska.Ciesielska, A.W. (2016). Zearalenones as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48. pp. 141-149.

Kumar, R. & Balachandran, C. (2009). Histopathological changes in broiler chickens fed aflatoxin and cyclopiazonic acid. *Vet. archiv*, 79. pp. 31-40.

LACTODATA. (2017). Producción lechera. LACTODADATA Información sobre el sector lechero. México. Recuperado de http://www.lactodata.info/docs/ind/lacto_ind_prod.pdf

- Lahouar, A., Marin, S., Crespo-Sempere, A., Saïd, S. & Sanchis V. (2017). Influence of temperature, water activity and incubation time on fungal growth and production of ochratoxin A and zearalenone by toxigenic *Aspergillus tubigenensis* and *Fusarium incarnatum* isolates in sorghum seeds. *International Journal of Food Microbiology*, 242. pp. 53-60.
- Maha, M., Hady, E., Banna, L., R. A., Teleb, H. M. & Shimaa, R. A. (2012). Evaluation of mannanoligosaccharide (Bio-Mos®) and esterified glucomannan (MTB-100®) dietary supplementation on growth performance, serum parameters and rumen ecology of Barki lambs under Egyptian environment. *APCBEE Procedia*, 4. pp. 158-162.
- Moretti, A. & Sarrocco, S. (2016). Fungi. *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, pp. 167-188.
- Patriarca, A. & Fernández, V. (2017). Prevalence of mycotoxins in food and decontamination. *Current Opinion in Food Science*, 14. pp. 50-60.
- Pei, S. C., Lee, W. J., Zhang, G. P., Hu, X. F., Eremin, S. A. & Zhang L.J. (2013). Development of anti-zearalenone monoclonal antibody and detection of zearalenone in corn products from China by ELISA. *Food Control*, 31. pp. 65-70.
- Pelegrina, D. (2017). 2º Foro Nacional de Lechería. México. Perspectivas de la producción de Leche Nacional e Internacional y las oportunidades de desarrollo, competitividad y sustentabilidad en la producción lechera. México. FEMELECHE. Recuperado de <http://femeleche.org.mx/foro/presentaciones.php>
- Perusia, O. & Rodríguez, R. (2001). Micotoxicosis. *Rev. Investigacion Veterinaria Perú*. Vol 12. Nº 2. pp. 87-116.
- Petersson, S., Wittrup, M., Axberg, K., Hult, K. & SchnÜRer, J. (1998). Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonist yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycological Research*, 102. pp. 1003-1008.

Ramos, A.J. (2011). *Micotoxinas y Micotoxicosis*. Madrid, España. AMV Ediciones. pp. 45-202.

Sobczuk, K. & Sobczuk, A. (2017). New classification system of endometrial hyperplasia WHO 2014 and its clinical implications. *Menopause Rev*, 16(3). pp. 107-111.

Stinshoff, H., Kruse, S., Poppicht, F., Dänicke, S. & Wrenzycki, C. (2013). Effects of a controlled dietary exposition to zearalenone on selected reproductive parameters in dairy cows. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1). pp. 149-150.

Tadapaneni, R. K., Yang, R., Carter, P. & Tang, J. (2017). A new method to determine the water activity, and the net isosteric heats of sorption for low moisture foods at elevated temperatures. *Food Research International*, 102. pp. 203-212.

Thongrussamee, T., Kuzmina, N. S., Shim, W. B., Jiratpong, T., Eremin, S. A., Intrasuk, J & Chung, D. H. (2008). Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of zearalenone in cereals. *Food Additives & Contaminants*, 25:8. pp. 997-1006.

Wihltow, L.W. & Hagler, W.M. (2004). *Mycotoxins in dairy cattle: occurrence, toxicity, prevention and treatment*. North Caroline State University. pp. 133-138.

Yiannikouris, A., Andre, G., Buléon, A., Jeminet, G., Canet, I., François, J., Bertin, G. & Jouany, JP. (2004). Comprehensive conformational study of key interactions involved in zearalenone complexation with α -D-glucans. *Biomacromolecules*, 5. pp. 2176-2185.

Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C.-G., Bertin, G., Jeminet, G. & Jouany, J.-P. (2004). Adsorption of zearalenone by β -D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of food protection*, 67. pp. 1195-1200.

Zain, M. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15. pp. 129-144.

Zhao, F., Shen, Q., Wang, H., Han, X. & Yang, Z. (2017). Development of a rapid magnetic bead-based immunoassay for sensitive detection of zearalenone. *Food Control*, 79. pp. 227-233.

Zinedine, A., Soriano, J.M., Moltó, J.C. & Mañes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45. pp. 1–18.