UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

Monografía

" LAS FUMONISINAS Y SU IMPACTO A LA SALUD ANIMAL "

PRESENTA:

JOAQUÍN VILLASEÑOR NAVARRO

DIRECTORA :

DRA. WALDINA PATRICIA REYES VELÁZQUEZ

ASESORES:

Dra. Esther Albarrán Rodríguez
M.V.Z. Silvia Ruvalcaba Barrera

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. Mayo 2002

CONTENIDO

Página

Agradecimientos i
Abreviaturas ii
Lista de Tablas iii
Lista de Figuras iv
Resumen v

I. INTRODUCCIÓN 1

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA 2

1. HISTORIA DE LAS FUMONISINAS Y SU PRESENTACIÓN NATURAL 2

1.1. Introducción 2
1.2. Historia 2
1.3. Métodos Analíticos 4
1.4. Presentación Natural 4
1.5. Distribución Mundial de la presentación natural de FB_1, FB_2 y FB_3 7

2. PRODUCCIÓN DE FUMONISINAS 8

2.1. Introducción 8
2.2. Taxonomía y biología de *Fusarium verticillioides* 8
2.3. Fase asexual (anamorfo) 9
2.4. Fase sexual (teleomorfo) 9
2.5. Morfología y pigmentación de las colonias 10
2.6. Ocurrencia y patogenicidad en plantas 10
2.7. Ciclo biológico de *F. verticillioides*. 12
2.8. Producción de micotoxinas por *F. verticillioides* 13
2.9. Producción de fumonisinas en campo y almacén 15
2.10. Producción de fumonisinas en el laboratorio 17

3. DISTRIBUCIÓN DE LAS FUMONISINAS EN LOS ALIMENTOS . . 21

3.1. Introducción 21
3.2. Incidencia de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en maíz . . 21
3.3. Distribución mundial de las Fumonisinas 23

BIBLIOTECA CUCBA

Página

4. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS FUMONISINAS 26

4.1. Introducción 26
4.2. Leucoencefalomalacia equina (LEME) 26
4.3. Edema pulmonar porcino (EPP) 28
4.4. Toxicidad en pollos de engorda 28
4.5. Hepatosis y nefrotoxicidad en roedores 29
4.6. Cáncer esofágico humano 31

5. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS FUMONISINAS 33

5.1. Introducción 33
5.2. Alteración del metabolismo de esfingolípidos 33
5.3. Posibles mecanismos de toxicidad de las fumonisinas. 40
5.4. Posibles mecanismos de las fumonisinas como inductores de cáncer 42

6. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE FUMONISINAS 45

6.1. Introducción 45
6.2. Preparación de las muestras 45
6.3. Cromatografía de capa fina 47
6.4. Cromatografía de líquidos de alta precisión. 48
6.5. Técnica de inmunoensayo de ELISA 50
6.6. Cromatografía por inmunoafinidad y detección fluorométrica . . . 52

7. EFECTO DE LOS PROCESOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LAS FUMONISINAS 54

7.1. Introducción 54
7.2. Tratamientos Biológicos 54
7.3. Métodos Físicos 54
7.4. Tratamientos Químicos 55
7.5. Procesos Térmicos 55
7.6. Proceso de nixtamalización 57

Página

8. REDUCCIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS CON LA CONTAMINACIÓN DE FUMONISINAS EN MAÍZ 59

8.1. Introducción 59
8.2. Control y Prevención de *Fusarium verticillioides* 59
8.3. Reducción de la Contaminación por Fumonisinas 62
8.4. Estimación del riesgo de exposición a fumonisinas 63
8.5..Estrategias para el control de fumonisinas 67

III. CONCLUSIONES 69

IV. BIBLIOGRAFÍA 70

AGRADECIMIENTOS

A mis padres
Gustavo Villaseñor García y Esther Navarro de Villaseñor
que Dios los bendiga por todo lo que han hecho por mi,
Gracias.

A mi Universidad

A la Dra. Waldina Patricia Reyes Velázquez, por la Dirección de este trabajo.

A la Dra. Esther Albarrán Rodríguez y a la M.C. Silvia Ruvalcaba Barrera por su asesoría.

ABREVIATURAS

AAL:	*Alternaria alternata Lycospersi*
ANOVA:	Análisis de varianza
AP_1= HFB_1	Aminopentol $_1$ = hidrolizado de fumonisina B_1
AP_2= HFB_2	Aminopentol $_2$ = hidrolizado de fumonisina B_2
$Ca(OH)_2$:	Hidróxido de calcio
CNIMT:	Cámara Nacional de la Industria de la Masa y Tortilla
Co-A:	Coenzima A
CUCBA:	Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
ELISA:	Técnica de ensayo inmunoabsorbente con enzima Ligada (Enzimatic link immunoabsorbent análisis)
EPP:	Edema pulmonar porcino
FAO:	Organización para la Agricultura y Alimentación (Food and Agriculture Organization)
FB_1:	Fumonisina B_1
FB_2:	Fumonisina B_2
FB_3:	Fumonisina B_3
FDA:	Administración de Medicamentos y Alimentos (Food and Drugs Administration)
g:	gramo
IC_{50}:	Concentración inhibitoria para el 50% de los animales
LEME:	Leucoencefalomalacia equina
M:	Molar
MCE:	Mercaptoetanol
min:	minuto
mL:	mililitro
msnm:	metros sobre el nivel del mar
µg/g:	microgramo por gramo
µL:	microlitro
µm:	micrómetro
N:	Normal
n:	número de muestras
NOEL:	Nivel de efectos no observados
OPA:	Ophthaldialdehido
PBS:	Solución buffer de fosfatos
P.M:	Peso molecular
rpm:	revoluciones por minuto
s	Desviación estándar
UFC g-1:	unidades formadoras de colonias por gramo de muestra
UDG:	Universidad de Guadalajara
TDI:	Consumo diario tolerable
W:	oeste
ZMG:	Zona metropolitana de Guadalajara

LISTA DE TABLAS

Tabla Página

1. Tipos de Fumonisinas 14

2. Producción de fumonisina B_1 en cultivo a partir de diferentes cepas de *Fusarium verticillioides*. 18

3. Contenido de *Fusarium* en el maíz y en fracciones 21

4. Niveles de fumonisinas en harina comercial 24

5. Posibles mecanismos de carcinogenicidad de las fumonisinas 43

6. Efecto de la temperatura sobre fumonisinas en harina de maíz. 55

7. Guía de niveles recomendables de fumonisinas para humanos y animales (publicada el 6 de Noviembre del 2001) 66

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	*Fusarium verticillioides* a) cadenas de microconidios	10
2.	Estructura química de las fumonisinas	13
3.	Metabolismo normal de Esfingolípidos	34
4.	Alteración del metabolismo de Esfingolípidos	36
5.	Determinación de fumonisinas por el método de ELISA	50
6.	Determinación de fumonisinas por cromatografía de inmunoafinidad y detección fluorométrica	52
7.	Estructura química del hidrolizado de FB_1 (AP_1)	57

RESUMEN

Las fumonisinas, micotoxinas cancerigenas, fueron aisladas primeramente de cultivos de *Fusarium verticillioides* y se encuentran con alta frecuencia en el maíz para consumo humano y animal. La fumonisinas son diesteres de ácido tricarboxilico y amino-alcoholes de 22 carbones, de las cuales las fumonisina B_1 (FB_1), FB_2 y FB_3 son las de mayor importancia por su actividad promotora de cáncer (Gelderblom *et al.*, 1988). Las investigaciones relacionadas con la incidencia de fumonisinas en el maíz indican que la mayor contaminación se presenta en harina y maíz parcialmente molido, moderada en cereal y baja en tortilla y totopos (Stack & Eppley, 1992). Los niveles de contaminación reportados varían de acuerdo al genotipo de maíz y a la localización geográfica, los estudios reportan niveles desde 0.1 μg/g en Suiza, 6.8 μg/g en Italia, 4.1 μg/g en Japón y Nepal, 4.45 μg/g en Portugal, 2.8 μg/g en Estados Unidos de Norteamérica. El mecanismo de daño de las fumonisinas se relaciona con la alteración del metabolismo de esfingolípidos, al ser inhibidoras de la N-aciltransferasa esfingonina (esfingosina). La detección de esta alteración se observa por el incremento de los grupos esfingoides: esfingonina y esfingosina, misma que puede ser predictiva para detectar los efectos en las células debido a que estos compuestos juegan un papel importante en la estructura de las membranas. Entre los principales efectos biológicos se encuentran la leucoencefalomalacia equina, caracterizada por lesiones necróticas licuefactivas en la materia blanca del cerebro, enfermedad fatal de equinos, y el edema pulmonar porcino, caracterizada por recumbencia y muerte. La Asociación Americana de Diagnóstico Veterinario del Comité de Micotoxinas recomienda que los alimentos de equinos y cerdos no deben contener niveles superiores de 5 y 10 μg de fumonisinas/g respectivamente. Entre las principales técnicas analíticas desarrolladas para la detección de micotoxinas, destacan la Cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC), la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y las técnicas desarrolladas por anticuerpos mono y policlonales. Entre las medidas preventivas y de control se pretende evitar la contaminación por F. verticillioides, principal especie productora de fumonisinas, además de evitar el estrés en el cultivo. Una vez presentes los niveles de fumonisinas en el maíz se recomiendan diversos tratamientos como la amoniación y la nixtamalización, que permiten la descontaminación y reducen el riesgo de exposición en animales. Recientemente la FDA junto con el Instituto de Seguridad de Alimentos y Aplicaciones en Nutrición y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, proporcionaron una guía de niveles recomendables en alimentos de humanos y animales, lo cual permite reducir los efectos adversos a la salud por la exposición a fumonisinas.

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de las fumonisinas, grupo de micotoxinas producidas especialmente por *Fusarium verticillioides*, es de gran importancia a nivel medicina veterinaria por las grandes perdidas económicas que se presentan en las explotaciones pecuarias al ser responsables de la leucoencefalomalacia equina y del edema pulmonar porcino, además de ocasionar reducción en los parámetros productivos e inmunosupresión en la mayoría de las especies productivas. Representan un riesgo a la salud publica al estar estrechamente relacionadas con el cáncer esofágico de humanos.

A partir de 1988, año en el que se caracterizaron y elucidaron las fumonisinas (Bezuidenhout y Gelderblom), las investigaciones han incrementado el interés en el ámbito mundial, y al igual que las aflatoxinas en la actualidad representan un desafió para los organismos internacionales que emiten la reglamentación para el control y prevención de ellas en los alimentos.

Debido a que la mayoría de la información se encuentra en artículos de publicaciones extranjeras es difícil tener acceso, por lo que realizar una revisión de las investigaciones sobre las fumonisinas y su impacto a la salud de animales y humanos es de gran importancia, siendo el objetivo de esta revisión bibliográfica, poner al alcance de alumnos y profesores dedicados al aprendizaje y enseñanza de la carrera de medicina veterinaria, información actualizada en el tema, que permita involucrarse en las medidas de prevención y control en la contaminación de fumonisinas en los alimentos destinados al consumo animal.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

1. HISTORIA DE LAS FUMONISINAS Y SU PRESENTACIÓN NATURAL

1.1. Introducción.

El hongo *Fusarium verticillioides* es uno de los hongos de campo de mayor prevalencia en el maíz (*Zea mays L*) de consumo humano y animal a nivel mundial (Marasas *et al.*, 1979). Las fumonisinas, micotoxinas cancerígenas, fueron aisladas primero a partir de cultivos de la cepa MRC 826 de *F. verticillioides* por Gelderblom *et al.* (1988) en el Consejo de Investigaciones Médicas de Sudáfrica. Las estructuras de las fumonisinas fueron elucidadas con la colaboración de científicos del Consejo de Investigaciones Científicas e Industriales de Pretoria (Bezuidenhout *et al.*, 1988).

1.2. Historia.

1881 – 1988

Saccardo (1881) describió a (*Oospora) Fusarium verticillioides* en maíz implicado en pelagra en Italia. Butler (1902) reprodujo leucoencefalomalacia (LEME) en caballos con maíz mohoso contaminado naturalmente en Estados Unidos de Norteamérica (EUA). Sheldon (1904) describió *Fusarium veritcillioides* en maíz implicado en toxicosis de granjas de animales de EUA. Wilson & Marapont (1971) reprodujeron LEME en monos con cultivos puros de *F. verticillioides* en maíz de Egipto. Kellerman *et al.* (1972) indujo el síndrome hepatotóxico en caballos con cultivos puros de *F. verticillioides* en maíz de Sudáfrica. Marasas *et al.* (1976) reprodujeron LEME en caballos con cultivos puros de *F. verticillioides* en maíz de Sudáfrica. Marasas *et al.* (1981) demostró que *F. verticillioides* es significativamente más prevalente en el maíz de áreas de alta incidencia cáncer esofágico humano (CE) que en áreas de baja incidencia. Kriek *et al.* (1981) indujo edema pulmonar en cerdos con cultivos puros de *F. verticillioides* en maíz de

Sudáfrica. Marasas *et al.* (1984b) induce cáncer hepático en ratas con cultivos puros de *F. verticillioides* en maíz de Sudáfrica. Gelderblom *et al.* (1988) demostró la actividad promotora de cáncer por cultivos puros de *F. verticillioides* en hígado de rata en un bioensayo de corto tiempo de iniciación/promoción de cáncer.

1988 – 1991

1988 – Año del Aislamiento y Caracterización. Gelderblom *et al.* (1988) aislaron fumonisina B_1 (FB_1) y B_2 (FB_2) a partir de cultivos de *F. verticillioides* de la cepa MRC 826. Bezuidenhout *et al.* (1988) elucidó las estructuras de FB_1 y FB_2 Marasas *et al.* (1988) indujeron un síndrome similar de LEME en caballos por inyección intravenosa de FB_1.

1989 - Año de la Confirmación, Expectación y Preparación. Laurent *et al.* (1989) aislaron y caracterizaron dos nuevas micotoxinas a partir de *F. verticillioides*: macrofusina y micromonilina. La estructura de la macrofusina demostró ser idéntica a fumonisina B_1. Laurent *et al.* (1989) confirmaron la inducción de un síndrome similar de LEME en caballos por inyección intravenosa de FB_1. Voss *et al.* (1989) detectaron FB_1 y FB_2 en dos muestras de maíz asociadas con brotes de campo de LEME en caballos, pero no cuantificaron niveles.

1990 – Año del Gran brote Americano de LEME en caballos y de EPP de cerdos, Métodos Analíticos y Presentación natural. El maíz cosechado de EUA en 1989 causó numerosos brotes de LEME en caballos y EPP en cerdos durante las estaciones de otoño de 1989 e invierno de 1990 (Harrison *et al.*, 1990; Ross *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1990).

Año del Caballo: Kellerman *et al.* (1990) reprodujo lesiones en cerebro de LEME en dos caballos por dosis oral de FB_1. Finalmente se considera a la FB_1 como responsable causal de LEME.

Año del Cerdo: Harrison *et al.* (1990) reprodujeron el EPP caracterizado por edema pulmonar e hidrotorax en un cerdo por inyección intravenosa de FB_1.

1.3. Métodos Analíticos.

Los métodos analíticos para la detección de FB_1 y FB_2 en maíz desarrollados y que se usaron para determinar los niveles de presentación natural en los primeros tiempos fueron: cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC), maleyl como derivatizante de FB_1 con detección ultravioleta y fluorescamina derivatizante de FB_1 con detección fluorescente (Sydenham *et al.*, 1990a).

Análisis con HPLC y pre-columna, derivatización con o.phthaldialdehydo (OPA) y detección fluorescente, los límites de detección de 50 ng/g de FB_1 y 100 ng/g de FB_2 (Shephard *et al.*, 1990). Análisis por hidrólisis y cromatografía de gases acoplada a espectometría de masas (GC/MS) con baja sensibilidad en ppm (Plattner *et al.*, 1990).

1.4. Presentación Natural.

La presentación natural de niveles de FB_1 y FB_2 en maíz asociado con brotes de LEME fue reportada por Shephard *et al.* (1990); Plattner *et al.* (1990); y Wilson *et al.* (1990). Una muestra de alimento balanceado comercial de Sudáfrica contenía 8.85 μg/g de FB_1 y 3 μg/g de FB_2 (Shephard *et al.*, 1990). Dos muestras de maíz de EUA contenían de 12-130 μg/g de FB_1 y < 1-17 μg/g de FB_2 (Plattner *et al.*, 1990). Tres muestras de maíz de EUA contenían 37-122 μg/g de FB_1 y 2-23 μg/g de FB_2 (Wilson *et al.*, 1990).

Los niveles de FB_1 y FB_2 en maíz de cultivo casero para consumo humano a partir de áreas de alta incidencia de CE en Transkei, Sudáfrica fueron reportados por Sydenham *et al.* (1990 a,b). Maíz visiblemente sano e infectado con *Fusarium* contenían 44 y 83 μg/g de FB_1 respectivamente (Sydenham *et al.*, 1990a).

Muestras de áreas con alta incidencia de CE en Transkei, contenían niveles mayores tanto de FB_1 (3.45-46.9) μg/g y FB_2 (0.9-16.3 μg/g) que en las áreas de baja incidencia (Sydenham *et al.*, 1990b).
Niveles de FB_1 y FB_2 de presentación natural en maíz comercial fueron reportados por Shephard *et al.* (1990). Tres muestras de maíz comercial procedente de Sudáfrica contenían FB_1 en niveles de 0.4-4.4 μg/g y de FB_2 de 0.1-1.3 μg/g.

Tres publicaciones durante 1990 afirman ser los primeros reportes de la presentación natural de niveles de fumonisinas en maíz:

- Sydenham *et al.* (1990a): "Este es el primer reporte conclusivo de la presentación natural de FB_1 en maíz" J. Agric. Food Chem. 38(1): 285-290. Publicado en enero de 1990, aceptado en agosto 14 de 1989.
- Shephard *et al.* (1990): "Esta publicación reporta por primera vez, un método cuantitativo y sensible de HPLC para la determinación simultanea de FB_1 y FB_2 en maíz contaminado en forma natural y en raciones de animales". Este método fue utilizado para determinar FB_1 y FB_2 en muestras de raciones asociadas con brotes de LEME en Sudáfrica. J. Liquid Chromat. 13(10): 2077-2087. Publicado en junio de 1990, aceptado en marzo 15 de 1990.
- Plattner *et al.* (1990): "Nuestro reporte provee el primer informe sobre los niveles de fumonisinas en maíz consumido por caballos que murieron por LEME. Mycologia 82(6): 698-702. Publicado en noviembre-diciembre de 1990, aceptado en julio 5 de 1990.

1991 - Año de nuevas fumonisinas, nuevos productores y esfingolípidos.
Cawood *et al.* (1991) aislaron y caracterizaron dos nuevas micotoxinas, FB_3 y FB_4 a partir de cultivos de *F. verticillioides* MRC 826. FA_1 y FA_2 fueron referidos por Bezuidenhout *et al.* (1988).

Nuevos productores de fumonisinas: Thiel *et al.* (1991[a]) confirmaron lo reportado por Ross *et al.* (1990), *F. proliferatum* productor de FB_1 y FB_2 y reportaron la producción por *F. nygamai.*

Esfingolípidos: Wang *et al.* (1991) reportaron que fumonisinas son estructuras similares a esfingosina y son inhibidores naturales de la biosíntesis de esfingolípidos.

Año de la rata: Gelderblom *et al.* (1991) indujeron cáncer hepático en ratas mediante alimentación con dietas que contenían 50 μg/kg de FB_1 durante 18-26 semanas.

Presentación natural de FB_1.

La presentación natural de FB_1 fue reportado por primera vez por Sydenham *et al.* (1990a) en maíz mohoso de cultivo casero en áreas de alta incidencia de CE en Transkei, Sudáfrica a niveles de 44-83 μg/g.

Presentación natural de FB_2.

La presentación natural de FB_2 fue reportada por Shephard *et al.* (1990) en muestras de raciones base-maíz asociadas con brotes de campo de LEME en Sudáfrica, los niveles fueron 3 μg/g.

Presentación natural de FB_3.

La presentación natural de FB_3 fue reportada por Shephard *et al.* (1992) en muestras de maíz mohoso en EUA a niveles de 64 μg/g.

1.5. Distribución Mundial de la presentación natural de FB_1, FB_2 y FB_3.

Alemania: Usleber *et al.* (1994). Argentina: Sydenham *et al.* (1993[a]); Viljoen *et al.* (1993). Austria: Lew *et al.* (1991). Brasil: Sydenham *et al.* (1992). Bulgaria: Sydenham *et al.* (1993b). China: Ueno *et al.* (1993); Chu & Li (1994). Canadá: Sydenham *et al.* (1991); Scott & Lawrence (1992). Egipto: Sydenham *et al.* (1991). Estados Unidos de Norteamérica: Plattner *et al.* (1990); Harrison *et al.* (1990); Wilson *et al.* (1990); Ross *et al.* (1991a,b) Sydenham *et al.* (1991); Thiel *et al.* (1991a); Colvin & Harrison. (1992); Eppley & Stack (1992); Haschek *et al.* (1992); Osweiler *et al.* (1992); Sydenham *et al.* (1992a) Thiel *et al.* (1992); Wilson *et al.* (1992) Binkerd *et al.* (1993); Chamberlain *et al.* (1993); Grimes *et al.* (1993); Holcomb *et al.* (1993); Hopmans & Murphy (1993); Price *et al.* (1993); Riley *et al* . (1993); Ross *et al.* (1993); Viljoen *et al.* (1993); Maragos & Richard (1994); Motelin *et al.* (1994); Pestka *et al.* (1994); Ross (1994); Sydenham *et al.* (1994). Francia: Sydenham *et al.* (1993b). Hungría: Sydenham *et al.* (1993b). India: Chatterjee & Mukkerjee (1994). Italia: Caramelli *et al.* (1993); Doko & Visconti (1993, 1994); Usleber *et al.* (1994). Japón: Ueno *et al.* (1993). Kenia: Sydenham *et al.* (1993b). Nepal: Ueno *et al.* (1993). Nueva Zelanda: Mirocha *et al.* (1992b). Perú: Sydenham *et al.* (1990a,b 1991); Rheeder *et al.* (1990); Thiel *et al.* (1992); Viljoen *et al.* (1993); Rheeder *et al.* (1994). Suiza: Pittet *et al.* (1992). Reino Unido: Scudamore & Chan (1993). Venezuela: Stack & Eppley (1992). Zimbawe: Sydenham *et al.* (1993b). (Citado por Marasas, 1996).

2. PRODUCCIÓN DE FUMONISINAS.

2.1. Introducción.

Las fumonisinas son un grupo de micotoxinas de estructuras análogas relacionadas. Fueron aisladas originalmente de cultivos de *Fusarium verticillioides*, contaminante común del maíz, posteriormente se ha demostrado la producción por otras especies de *Fusarium* morfológicamente relacionadas (Nelson *et al.*, 1993). La especie *Fusarium verticillioides* es el agente causal de la pudrición de la mazorca y de la planta de maíz y produce infecciones sistémicas asintomáticas (Bacon y Nelson, 1994), por lo tanto el maíz puede contener altos niveles de fumonisinas aun cuando presente apariencia normal.

2.2. Taxonomía y biología de *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides J. Sheldon (anamorfo) fase asexual, pertenece al Reino Fungi, División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Tuberculariaceae. Mientras que la fase sexual es *Gibberella fujikuroi*, Sawada (teleomorfo), se ubica en la Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Subclase Pyrenomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae (Herrera & Ulloa, 1990). La taxonomía de *Fusarium* es compleja y confusa ya que se aplican diversos sistemas taxonómicos. El sistema propuesto por Nelson *et al.* (l983) establecen 12 secciones, entre las que se encuentra la sección Liseola, a la cual pertenece *F. verticillioides*.

El estado peritecial de este hongo consiste en un complejo de 6 diferentes especies o poblaciones biológicas designadas con las letras A a la F, miembros de las poblaciones A y F pertenecen a *Fusarium verticillioides*, las poblaciones B y E a *F. subglutinans y la* población D a *F. proliferatum* (Nelson *et al.*, 1994).

2.3. Fase asexual (anamorfo):

F. verticillioides J. Sheldon forma conidióforos en hifas aéreas; estos presentan una célula basal simple con 2 a 3 fiálides apicales laterales simples; miden de 20-30 μ de longitud, 2-3 μ de ancho en la base y 1.5 μ en el ápice. Los microconidios se forman agrupados en cabezas falsas sobre monofiálides y en cadenas basípetas originadas de conidióforos ramificados o en fiálides individuales. Son fusiformes, ovoides, elipsoidales o clavados, con la base ligeramente aplanada, usualmente mononucleares, miden de 1.5-3.5 x 5-12 μ.

Los macroconidios se desarrollan de fiálides en hifas laterales; a veces son escasos. En medio de cultivo hojas de clavel-agar (HCA), se producen masas abundantes en esporodoquios anaranjado-pálidos. Son alargados, delgados defalcados a casi rectos, con 3 a 7 septos; miden de 2.5-4 x 25-60 μ , y su pared es delgada. La célula apical es ligeramente curvada y ahusada en el extremo y la célula basal tiene forma de pie. Esta especie se distingue por las cadenas largas de microconidios producidos por monofiálides individuales (Figura 1) y la ausencia de clamidosporas (Booth, 1971; Burgess & Liddell, 1983; Nelson, *et al*, 1983).

2.4. Fase sexual (teleomorfo):

Gibberella fujikuroi produce peritecios individuales o en grupos, superficiales o sumergidos en el substrato, de globosos a subcónicos, azul-obscuros, ostiolados, de 220-300 x 250-375 μ. Las ascas son rectas, elipsoidales a clavadas, con 4-8 ascosporas hialinas, de helipsoidales a fusiformes, con 1-3 septos, con sus extremos redondeados, con estrechamiento en los septos y dispuestas oblicuamente en 1 o 2 series en el asca. Las masas de ascosporas son de color ocre-asalmonado; miden de 3.9-6 x 14-19 μ (Nelson *et al.*, 1983).

2.5. Morfología y pigmentación de las colonias:

En medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) el hongo forma micelio blanco, de crecimiento rápido. Al madurar la colonia produce pigmentaciones que fluctúan de anaranjado-violeta a violeta-obscuro, pálido, lila, vináceo, crema o magenta-obscuro, de acuerdo con el código de colores propuesto por Nelson *et al.* (1983). Algunos cultivos carecen de coloración. El micelio aéreo es denso, varía de velludo a afieltrado, de aspecto pulverulento por la formación de microconidios. Los esporodoquios están normalmente ausentes, cuando se presentan son de color anaranjado pálido a bronceado y están confluentes (Booth, 1971; Burgess & Liddell, 1983; Nelson, *et al.*, 1983).

2.6. Ocurrencia y patogenicidad en plantas.

Fusarium verticillioides es un hongo de distribución mundial, presente tanto en zonas de clima templado húmedo y subhúmedo como en zonas tropicales y subtropicales. Se ha encontrado en Alemania, América central, Argentina, Australia, Brasil, Canadá, sur de China, Egipto, Estados Unidos, Filipinas, Hong Kong, India, Indonesia, Israel, Italia, Jamaica, Japón, Libia, México, Nepal, Nigeria, Nueva Zelanda, Perú, Sudáfrica, Taiwan, Turkey y Zimbabwe. Aunque se encuentra raramente en zonas de temperatura fría, se ha reportado en Rusia e Islandia (Marasas *et al*, 1979; Miller *et al*, 1993; Nelson *et al*, 1991; Sydenham *et al*, 1992a).

Además de presentarse en el maíz, es común aislarlo de diversos cereales, incluyendo el trigo, arroz, sorgo y avena. También se presenta con menor frecuencia en otros alimentos como el frijol, cacahuate, plátano, pepino, soya, caña de azúcar y remolacha y productos no alimenticios como algodón y lino (Flood *et al*, 1990; Leslie *et al*, 1992). Se ha aislado también en forrajes como el pasto *Panicum coloratum* (Eiker, 1976), alfalfa y trebol rojo (Nelson *et al*, 1991). Este hongo puede descomponer la madera, algodón, papel filtro y puede oxidar

hidrocarburos y herbicidas. *F. verticillioides* se ha aislado ocasionalmente de varios tipos de agua como los estanques de estabilización de aguas negras y alcantarillados (Cooke, 1962). En Estados Unidos y Canadá se ha obtenido a partir de queratitis micóticas y de varios tipos de cáncer en pacientes humanos (Nelson *et al*, 1991).

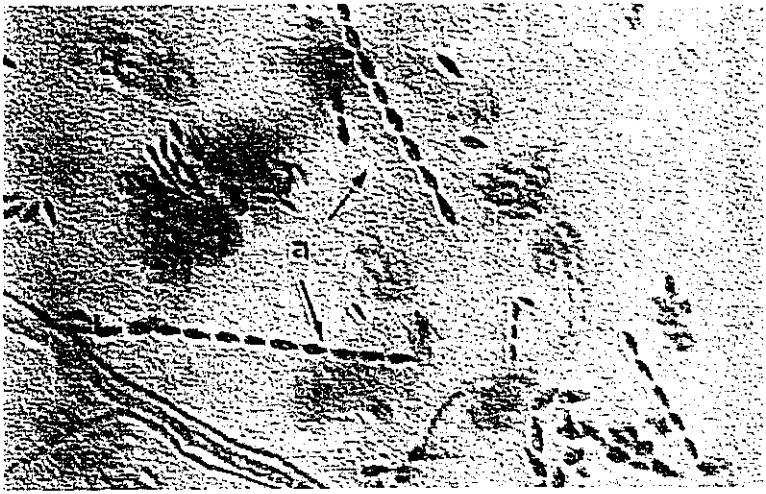


Figura 1. *Fusarium verticillioides* a) cadenas de microconidios.

2.7. Ciclo biológico de *F. verticillioides*.

El hongo inverna en los residuos de cosecha, en el suelo y como micelio en el tejido interno de la semilla de maíz (Burgess & Liddell, 1983). Los peritecios se forman a principios de otoño y liberan las ascosporas que son diseminadas e inician la infección primaria. En los períodos de clima húmedo y cálido, sobre las lesiones de las plantas afectadas se forman abundantes macro y microconidios que son transportados por el viento y actúan como inóculo secundario (Holliday, 1989).

La presentación de *F. verticillioides* en el maíz es de forma endofita y permanece en la planta asintomáticamente, expresión relacionada con la naturaleza genética del hongo, cultivo del maíz y condiciones ambientales. El hongo puede localizarse por debajo del tejido vascular de cada germen, desde su punta hasta donde se implanta en la mazorca, con escasas hifas en gérmenes sanos, sin embargo bajo condiciones inadecuadas de almacenamiento puede iniciarse una invasión mayor. También se encuentra en residuos de la planta del maíz especialmente tallo y mazorca, donde sobrevive en el suelo (Nelson, 1992a).

Estudios de laboratorio indican que *F. verticillioides* puede permanecer en la semilla del maíz viable hasta por 8 años, debido a su localización sistémica lo que provee condiciones favorables para mantener su virulencia y viabilidad por años. Los macroconidios de sobrevivencia mayor, actúan acarreando al hongo durante las estaciones, mientras que los microconidios, transportadas por el viento, funcionan como propágulos de infeccción secundaria, infectando la planta durante la estación de crecimiento. Se reporta que el hongo permanece en el suelo dentro de tallos enterrados a 30 cm, con humedad de 5 a 35 % , y temperatura de 5 a 10 °C durante 12 meses (Bacon & Nelson, 1994).

Los principales aspectos de la enfermedad del maíz por *F. verticillioides* son podredumbre de la mazorca, tallo y raíz, pudiendo variar el grado de infección de

acuerdo a la vía de entrada del hongo, lo cual puede ser a través de los estilos de la mazorca o por esporas procedentes del viento, resultando una infección temprana de los granos, otra posible vía de entrada a través de orificios causados por gusanos o insectos en el pericarpio del grano (Davis *et al*, 1989).

Además de la infección local, la planta de maíz puede llegar a ser infectada sistémicamente a partir de las semillas contaminadas, por lo que la infección se presenta durante o inmediatamente después de la germinación de la semilla, entrando el hongo en la región de la placa cotiledonaria cuando el tallo brota (germinación), o cuando la plúmula emerge del coléoptilo el hongo crece en el parénquima del tallo y es durante la floración cuando el micelio del hongo ramifica a toda la planta. Se ha encontrado también infección en las raíces primarias (Thomas & Buddenhagen, 1992).

2.8. Producción de micotoxinas por *F. verticillioides.*

Las principales micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides* son la moniliformina, fusarina C, ácido fusárico (fusarinas); y las fumonisinas (Nelson *et al*, 1994, Riley *et al*, 1993b).

Moniliformina.- Se reportó por primera vez a partir de una cepa de *F. verticillioides* (anteriormente *moniliforme),* del cual deriva su nombre (Cole *et al*,1973), sin embargo la cepa perdió su habilidad de producir moniliformina durante el curso del estudio para determinar la estructura de la toxina. Existen conflictos respecto a la producción de moniliformina por cultivos de *F. verticillioides,* ya que sólo 22% de las cepas toxigénicas produjeron químicamente niveles detectables de la micotoxina y el promedio de producción fue bajo (Marasas, 1986). Por lo general, cepas de *F. verticillioides* son pobres productoras de moniliformina, siendo otras especies mejores productoras como *F. subglutinans* (Nelson *et al*, 1994).

Fusarinas.- Estudios a partir de cepas de *F. verticillioides* cultivadas en maíz estéril, demostraron que 21 cepas de 33, fueron mutágenas a *Salmonella typhimurium* TA 100 (Bjeldanes & Thomson, 1979). Los principales compuestos mutágenos fueron fusarina C y el ácido fusárico. Debido que la fusarina C es un metabolito mutágeno, se realizaron experimentos de la actividad iniciadora de cáncer en ratas. Los resultados obtenidos (Gelderblom *et al.*, 1986) no apoyaron la teoría de que la fusarina C es cancerígena o es la causa de la hepatocarcinogenicidad de *F. verticillioides* MRC 826.

Fumonisinas.- Bezuidenhout y Gelderblom en 1988, caracterizaron la estructura de las fumonisinas como diésteres de ácido tricarboxílico y amino-alcoholes de 22 carbones (peso molecular de 721). De las 13 fumonisinas caracterizadas químicamente (Figura 2 y Tabla 1) las FB_1, FB_2 y FB_3 son consideradas de mayor interés por su actividad promotora de cáncer (Gelderblom *et al.*, 1988). Las fumonisinas son producidas principalmente por *F. verticillioides y F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, en una amplia distribución geográfica. (Nelson *et al.*, 1991, 1992c). Además de especies como *F. nygamai* Burgues & Trimboli, *F. anthophilum* Wollenw., *F. dlamini* Marasas, Nelson & Toussoun y *F. napiforme* Marasas, Nelson & Rabie (Nelson *et al.*, 1991, 1992c, Thiel *et al.*, 1991a).

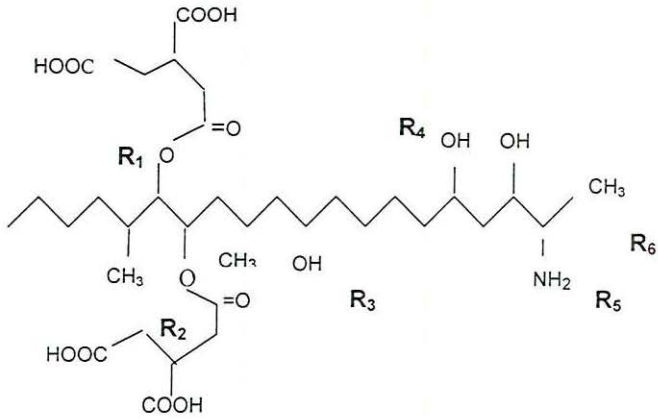


Figura 2. Estructura química de las fumonisinas (Shier *et al.*, 1995)

Tabla 1. Tipos de Fumonisinas (Musser & Plattner, 1997)

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	P.M
FA_1	TCA	TCA	OH	OH	NHCOCH3	CH3	763
FA_2	TCA	TCA	H	OH	NHCOCH3	CH3	747
FA_3	TCA	TCA	OH	H	NHCOCH3	CH3	747
FAK_1	=O	TCA	OH	OH	NHCOCH3	CH3	603
FB_1	TCA	TCA	OH	OH	NH2	CH3	721
FB_2	TCA	TCA	H	OH	NH2	CH3	705
FB_3	TCA	TCA	OH	H	NH2	CH3	705
FC_1	TCA	TCA	OH	OH	NH2	H	707
FP_1	TCA	TCA	OH	OH	3HP	CH3	800
FP_2	TCA	TCA	H	OH	3HP	CH3	784
FP_3	TCA	TCA	OH	H	3HP	CH3	784
PH_1a	TCA	OH	OH	OH	NH2	CH3	563
PH_1B	OH	TCA	OH	OH	NH2	CH3	653

FA_1; FA_2; FA_3; FAK_1; FB_1; FB_2; FB_3; FC_1; FP_1; FP_2; FP_3; PH_1a; PH_1b = tipos de fumonisinas; TCA = ácido tricarboxílico; OH = grupo hidroxilo; H = hidrógeno; 3HP = fosfato; NH_2 = grupo amino; CH_3 = grupo metilo; $NHCOCH_3$= acetilamina ; P.M.= peso molecular; R= radical.

Desde el descubrimiento en 1988, las fumonisinas han sido aisladas a partir del maíz, alimentos y piensos a base de este cereal, en Argentina, Brasil Canadá, China, Egipto, Estados Unidos, Nepal y Perú (Nelson *et al.*, 1991; Sydenham *et al.*, 1992a; Thiel *et al.*, 1991a). La localización en estas regiones de amplia distribución geográfica, sugiere que la producción de fumonisinas en el maíz es mundial.

2.9. Producción de fumonisinas en campo y almacén.

No se conoce con precisión el tiempo y el patrón de acumulación de las fumonisinas una vez infectada la planta. Las fumonisinas se han detectado en mazorcas de maíz, en glumas de inflorescencia viejas de maíz y en maíz molido. Las mayores concentraciones se han encontrado en las glumas de inflorescencia, sin embargo el maíz molido presenta concentración mayor que el maíz entero,

produciendo la mayoría de los problemas toxicológicos, particularmente en cerdos y equinos (Bacon & Nelson, 1994).

Fusarium verticillioides es un patógeno biotrófico, de relación no obligatoria. Se define principalmente como un hongo de campo, lo que implica que produce sus micotoxinas bajo condiciones de campo. Debido a que su relación con la planta no es obligatoria, se espera que en el grano, en sus fragmentos y en restos de plantas muertas sirvan de substrato para la producción de toxinas, particularmente bajo condiciones de almacenamiento.

Estudios de laboratorio han establecido que el rango de temperatura óptima para el crecimiento de *F. verticillioides* es de 22.5 a 27.5 °C, con un máximo de 32-37 °C y temperatura mínima de 2.5 a 5 °C. Estudios adicionales indican que potencial osmótico para el crecimiento vegetativo es de -180 bars de potencial de agua, mientras que para la germinación de conidios requiere de -140 bars. El óptimo potencial osmótico es -10 bars y no ocurre crecimiento a -150 bars (Bacon & Nelson, 1994).

Los estudios de laboratorio pueden ayudar a definir las condiciones necesarias para el crecimiento y producción de las fumonisinas en condiciones de almacenamiento. Los estudios hechos sobre el crecimiento de este hongo en almacenamiento son limitados y estos no fueron diseñados para determinar la producción de toxinas. Maíz con humedad entre 18.4 y 23% fue óptimo para el crecimiento del hongo, mientras que fue inhibido con 28% de humedad (Bacon & Nelson, 1994).

El crecimiento de *F. verticillioides* en el almacén es complejo ya que existió interacción entre la humedad y los niveles de oxígeno (0_2) y dióxido de carbono ($C0_2$). El hongo puede crecer en condiciones de almacén con 0% 0_2 y 60% de $C0_2$ a 26 °C, pero con niveles similares de $C0_2$ en la atmósfera del almacén, el crecimiento se reduce cuando la temperatura es de 12 °C (Bacon & Nelson, 1994).

El crecimiento de este hongo a 0% de 0_2 y alto $C0_2$ sugiere crecimiento anaeróbico en el almacén. Además el porcentaje de infección del grano por el hongo se pudo incrementar significativamente ($p< 0.05$) en el maíz cosechado con un promedio de humedad de 12.4% y almacenado por 8 meses (Marasas *et al*, 1979).

Las investigaciones respecto a las condiciones de almacenamiento indican que el hongo posee un alto potencial para producir micotoxinas bajo un amplio rango de condiciones de almacén (Bacon & Nelson, 1994).

2.10. Producción de fumonisinas en el laboratorio.

La evaluación de la capacidad productiva de fumonisinas por *F. verticillioides* en el laboratorio se basa en su cultivo en maíz estéril y en el análisis de la cantidad de la toxina producida (Alberts *et al.*, 1990 y 1993; Ross *et al.*, 1990). La producción en el laboratorio requiere del ajuste del contenido de humedad del maíz parcialmente molido a 43% y la esterilización en autoclave del maíz húmedo durante 30 minutos. El agua puede adicionarse antes de la esterilización o después ya esterilizada. El agua se debe dejar absorber por 1 o 4 horas después de la esterilización. La proporción de agua en el maíz es crítica ya que el exceso de agua reduce el rendimiento productivo del hongo (Bacon & Nelson, 1994).

Un aspecto crítico para la producción de fumonisinas es la cantidad de aire que el cultivo recibe, esto usualmente se controla con la reducción de la cantidad de maíz en el matraz y con el uso de tapones de ajuste ligeramente holgados. Se recomienda, 50 g de maíz en matraces Erlenmeyer de 300 mL de capacidad, 100 g de maíz para matraces Erlenmeyer de 500 mL, 500 g en matraces Fernbach de 2.8 L. Para pruebas de rutina se utilizan 50 g en matraces de 300 mL. Los matraces Fernbach se utilizan para la producción de fumonisinas a gran escala para investigaciones toxicológicas (Nelson *et al.*, 1991).

El inóculo utilizado es preparado a partir del crecimiento del hongo en medios tradicionales de laboratorio durante 1 a 2 semanas (Leslie *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1990; Sydenham *et al,* 1992b) o pueden utilizarse liofilizados de conidios (Thiel *et al.,* 1991a). Los cultivos son incubados en la obscuridad a 25 °C de 21 a 30 días, aunque períodos de tiempo mayores resultan en una producción mayor. El período depende del método usado y de la cantidad total de maíz utilizado en el fermentador. Durante los tres primeros días de incubación, los cultivos son agitados una vez o dos diariamente. Una alternativa de procedimientos de incubación es incubar dos semanas a 27°C, seguido por otras dos semanas a 15°C (Ross *et al.*, 1990).

Otros procedimientos para evaluar la producción de fumonisinas por cepas es a través de cultivos líquidos (Miller *et al.*, 1993). Dos condiciones de medios y cultivos se han utilizado, uno como cultivo estacionario por 29 días (Jackson *et al.*, 1990) y el otro es con cultivo en agitación por 14 días, considerando la reducción del tiempo de incubación, repetibilidad y el ligero incremento en el total de producción a partir de las cepas, este último método pudiera ser una alternativa de los cultivos líquidos (Miller *et al.*, 1993).

El rendimiento de producción por estos procedimientos indican que las cantidades de fumonisinas producidas son específicas por la cepas de *F. verticillioides* (Tabla 2). Estos resultados también indican que la mayoría de las cepas de este hongo a partir de diferentes áreas geográficas y substratos pueden producir estas micotoxinas, lo cual sugiere el potencial de producción de fumonisinas por cualquier cepa de este hongo es alta.

Durante una investigación realizada en Europa (España, Francia, Italia y Polonia) para evaluar la producción de fumonisinas por diferentes especies de *Fusarium* a partir de diversos substratos se observó que todas las cepas de *F. verticillioides* aisladas y una cepa de *F. proliferatum* produjeron fumonisinas en un amplio rango de concentraciones (0.7- 4,100 μg de FB_1/g). La mayor producción de fumonisinas

fue en el maíz (promedio, 1,259 μg/g) seguido por el trigo (promedio, 769 μg/g) y la cebada (promedio, 320 μg/g) (Visconti & Doko, 1994).

Tabla 2. Producción de fumonisina B_1 en cultivo a partir de diferentes cepas de *Fusarium verticillioides* *

Alimento de animales con maíz contaminado (USA)	Sorgo y Milo (Nigeria y Zimbawe)	Maíz mohoso (Nepal)	Alimento para animales con maíz de buena calidad (USA)	Queratitis micótica y cáncer (Canadá y USA)
M-2546 (2,589)	M-5054 (2,448)	M-5496 (nd)	M-211 (1927)	M-722 (1,914)
M-2552 (6421)	M-5067 (733)	M-5500(traza)	M-2232 (3,091)	M-773 (2,500)
M-2547 (144)	M-5068 (539)	M-5507(traza)	M-2270 (459)	M-1102 (nd)
M-2650 (traza)	M-5081 (traza)	M-5519 (60)	M-2285 (2,716)	M-1810 (130)
M-3031 (1,391)	M-5193 (traza)			M-2768 (nd)
M-3034 (6,090)	M-5243 (104)			M-5114 (2,900)
M-3041 (323)	M-5234 (95)			M-2978 (1,700)

* Número de acceso de las cepas de *F. verticillioides* en el Centro de Investigaciones de *Fusarium* con concentraciones de FB_1 en μg/kg dentro del paréntesis. (Bacon & Nelson, 1994).

Nelson *et al.* (1991, 1992b) reportan la producción de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* en diferentes substratos y áreas geográficas, encontrando considerable variación en las cantidades de fumonisinas por las cepas en las diferentes fuentes, pero en general la variación fue baja dentro de cada substrato. La FB_1 se produjo por la mayoría de las cepas (95%) a partir de los alimentos a base de maíz que estuvieron relacionados con casos de ELEM, por todas las

cepas en el maíz de buena calidad destinado a consumo en granjas, así como en semillas de Iowa tanto a niveles intermedios (50-500 μg/g) como altos (< 500 μg/g).

En contraste todas la cepas de Nepal a excepción de una, fueron bajas productoras de fumonisinas (49 μg/g). Cepas a partir de milo y sorgo de África, de dietas a base de maíz para ratas de laboratorio y del sorgo de Australia fueron productoras de niveles bajos e intermedios. Es de gran interés que la mayoría de las cepas (85%) a partir de queratitis micótica, úlceras y varios tipos de cáncer en humanos mostraran una producción de intermedia a alta (rango de 130 a 2,900 μg/g).

Musser & Plattner en 1997, analizaron la composición de fumonisinas en cultivos de *F. verticillioides, F. proliferatum y F. nygami*, encontrando concentraciones mayores de FB_1 en los cultivos de *F. verticillioides* (3,430 μg/g), en tanto que en los cultivos de las otras especies la concentración fluctuó de 1 a 1,017 μg/g. El estudio demostró la producción de fumonisinas de la serie P, siendo esta mayor bajo condiciones anaeróbicas.

Aunque existe variación en la producción de fumonisinas, existe alto potencial de producción en substratos naturales y en productos agrícolas por las cepas de *F. verticillioides* en diferentes áreas geográficas (Nelson *et al*, 1991, 1992b, 1992c).

3. DISTRIBUCIÓN DE LAS FUMONISINAS EN LOS ALIMENTOS

3.1. Introducción.

La mayoría del maíz y de sus productos derivados se encuentran con frecuencia contaminados con niveles apreciables de fumonisinas, influyendo las condiciones ambientales sobre el grado de contaminación (Shephard *et al.*, 1996). Productos de maíz con concentraciones importantes son la harina de maíz y maíz parcialmente molido (> 250 ng/g). Dietas de animales presentan mayor probabilidad de altos niveles de fumonisinas (> 5 μg/g), ya que pueden contener maíz dañado o quebrado, así como molido (Scott *et al.*, 1993).

3.2. Incidencia de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas en maíz.

Existen reportes del nivel de contaminación por *F. verticillioides* en diversos países, en los cuales resulta ser la especie de mayor frecuencia en el maíz amarillo y blanco, influyendo las condiciones ambientales del año de cosecha y la localización geográfica. En Estados Unidos en los años de cosecha de 1991 y 1992 se reportó un rango de infección del 28 al 94% por especies de *Fusarium*, existiendo en 1991 mayor contaminación por *F. verticillioides* en el maíz amarillo, especialmente en el maíz molido, en tanto que durante la cosecha de 1992 se encontró principalmente *F. subglutinans* en maíz blanco, lo cual pudo ser debido a las condiciones húmedas y frías que prevalecieron durante el año, lo que favoreció la invasión de otras especies de *Fusarium* (Bullerman & Draughon, 1994; Bullerman & Tsai, 1994).

En otro estudio, el análisis en diferentes muestras de maíz y sus fracciones, permitió determinar alto contenido de diversas especies de *Fusarium*, además se encontró mayor contaminación en las fracciones del germen y salvado, siendo consistentemente alto el desarrollo de unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1}), mientras que en las hojuelas de maíz se observó menor contaminación (tabla 3).

La alta prevalencia del hongo en el germen y salvado puede ser indicativo de la localización del hongo en el área del germen, bajo el pericarpio, así como la baja contaminación o ausencia en las fracciones de hojuelas puede explicar porqué el cereal de maíz consistentemente se encuentra libre de fumonisinas (Katta, 1994).

Tabla 3. Contenido de *Fusarium* en el maíz y en fracciones (Katta, 1994).

No. de muestra	Infección por *Fusarium* (%)	Fracciones de maíz Cuentas de Fusarium (UFC g^{-1})			
		Salvado	Germen	Hojuelas	Harina
10493	25	< 100	4800	< 100	1600
11193	28	2000	8900	< 100	< 100
11893	24	< 100	6000	< 100	900
12593	21	< 100	16000	< 100	100
20193	23	1000	350	< 100	< 100
20893	20	4000	< 100	< 100	1300
21593	20	<100	4200	< 100	1400
22293	13	< 100	100	< 100	100
30193	13	< 100	300	< 100	< 100
30893	17	< 100	4600	< 100	2700
31593	10	< 100	2900	< 100	600
32293	12	64000	9400	< 100	100
promedio	19	5600	5200	< 100	730

En investigaciones desarrolladas en Argentina se evaluó la contaminación por especies de *Fusarium* en diferentes estados de madurez del maíz, encontrándose *F. verticillioides* como la especie de mayor prevalencia durante las etapas finales de madurez, mientras que *F. proliferatum* se encontró en altos niveles en los estados de madurez intermedios, lo que concuerda con lo reportado en otros estudios (Chulze *et al*, 1996; Doko *et al*, 1995).

Estudio realizado al noreste de la república mexicana permitió el aislamiento de *F. verticillioides* en 61% de las mazorcas analizadas, presentando el 97% de las cepas capacidad productiva de fumonisinas, con un rango de 10 a 9,000 ppm (Desjardins *et al*, 1994).

3.3. Distribución mundial de las Fumonisinas

Estudios conducidos por la FDA en alimentos obtenidos de supermercados en el área de Washington, D.C., reportaron la mayor contaminación por fumonisinas en harina y en maíz parcialmente molido, moderada en pan y bajos niveles en tortillas y totopos (Stack & Eppley, 1992).

En Suiza la mayor contaminación prevaleció en dichos productos, encontrándose en el 75% de las muestras niveles por debajo de 0.1 μg/g (Pittet *et al*, 1992). En campos de Argentina se reportó la presencia de *F. verticillioides* y fumonisinas, la mayoría de las muestras tuvieron niveles de fumonisinas mayores de 2 μg/g y algunos fueron tan altos como 6-10 μg/g. El rango de contaminación por *F. verticillioides* fue de 10,000 a 700,000 UFC g^{-1}, estos niveles se presentaron en el maíz aparentemente sano (Sydenham *et al*, 1993).

Doko & Visconti (1993) indican contaminación en maíz y sus productos en Italia, los niveles presentes fueron de 0.01 a 6.8 μg/g. De 26 genotipos de maíz, cuatro mostraron niveles superiores a 1 μg/g, conteniendo el maíz comercial niveles mayores de 2 μg/g, mientras que los productos de maíz con mayor contaminación fueron la harina, el maíz inflado y la polenta (un tipo de harina).

Ueno *et al.* (1993) en un estudio realizado en China, Japón y Nepal encontraron en el maíz entero niveles de FB_1 de 0.6 a 4.1 μg/g y en gluten de maíz los niveles fueron de 0.3 a 2.4 μg/g, demostrando que la incidencia de fumonisinas a nivel mundial en el maíz es similar a los niveles encontrados en el maíz de Asia

(Castelo *et al*, 1998; Murphy *et al*, 1993; Sydenham *et al*, 1991; Sala *et al*, 1994; Viquez *et al*, 1996).

Investigaciones relacionadas con la incidencia de fumonisinas en diferentes genotipos de maíz cultivados en Europa y África, reportan altos niveles de contaminación en Italia, Portugal y Zambia, con incidencia del 100%, encontrándose niveles de fumonisinas (FB_1+FB_2) de 2,850, 4,450 y 1,710 ng/g respectivamente. Se observó una tendencia general de alta contaminación en genotipos de maíz de madurez tardía (FAO) o de endospermo tipo dentado, aunque también las condiciones ambientales del área especifica de cultivo juegan un papel importante en la formación de fumonisinas en el maíz, se requieren estudios que valoren la interacción genotipo-área-estación (Doko *et al*, 1995).

El rango de concentración reportado por presentación natural en maíz asociado con cáncer esofágico es de 0 a 10,500 ng/g (ppb) en maíz considerado como "sano" y entre 600 y 63,200 ng/g en maíz obviamente "mohoso" (Hopmans *et al*, 1993; Sydenham *et al*, 1991). Los niveles de fumonisinas en alimentos de animales asociados con brotes de leucoencefalomalacia equina se encuentran entre 1,300 y 150,000 ng/g de FB_1, 100 y 23,000 ng/g de FB_2, mientras que los niveles asociados con el edema pulmonar porcino son 105,000 a 155,000 ng/g de FB_1 (Colvin *et al*, 1993; Haschek *et al*, 1992).

El maíz considerado "sano" puede o no tener correlación entre los niveles totales de fumonisinas y el número de unidades formadoras de colonias (UFC g^{-1}) de este hongo, sin embargo existe cuando los datos se expresan en incidencia (porcentaje de infección del grano) (Rheeder *et al*, 1992; Sydenham *et al*, 1990 b; Sydenham *et al*, 1992 b).

Los productos de alimentos que han sido analizados para evaluar la contaminación con fumonisinas, incluyen maíz parcialmente molido, harina, cereal, tortillas, totopos, palomitas y torta de maíz. La tabla 4 muestra los niveles de

fumonisinas en harina de maíz comercial, muestras obtenidas de Canadá, Egipto, Perú, Estados Unidos y Sudáfrica (Sydenham *et al*, 1991).

Tabla 4. Niveles de fumonisinas en harina comercial (Sydenham *et al*, 1991)

		Niveles de fumonisinas (μg/g)	
País	No. de muestras	FB_1	FB_2
Canadá	2	0-0.05	0
Egipto	2	1.8-3.0	0.5-0.8
Perú	4	0-0.7	0-0.1
Sudáfrica	52	0-0.5	0-0.1
Estados Unidos	17	0-2.8	0-0.9

La proporción y distribución de las fumonisinas B_1 y B_2 se determinaron en productos obtenidos a partir de maíz contaminado en forma natural utilizado para fermentación de etanol y en operaciones de molienda húmeda. Las fumonisinas fueron estables a las condiciones utilizadas en las fermentaciones de etanol y se concentraron en el grano seco destilado, una fracción generalmente utilizada en la alimentación animal. No se encontraron dichas micotoxinas en el etanol. El almidón procedente de la molienda húmeda del maíz, naturalmente contaminado con 13.9 μg de FB_1/g, fue libre de fumonisinas. Las otras fracciones contenían: gluten (5.1-5.8 μg de FB_1/g, 4.7-4.9 μg de FB_2/g); fibra (2.7-5.7 μg de FB_1/g, 2.1-3.1 μg/g de FB_2/g) y en germen (1.3-3.1 μg de FB_1/g y 0.7-1.6 μg de FB_2/g) El agua del proceso contenía el 22% de las fumonisinas recuperadas.

4. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LAS FUMONISINAS

4.1. Introducción.

Desde el descubrimiento y caracterización de las fumonisinas en 1988 (Bezuidenhout *et al.*, 1988; Gelderblom *et al.*, 1988), han sido el foco de numerosas investigaciones alrededor del mundo. Este interés fue generado debido a la actividad promotora de cáncer de estas micotoxinas (Gelderblom *et al.*, 1991), a sus efectos tóxicos en animales, especialmente caballos y cerdos (Marasas *et al.*, 1988; Harrison *et al.*, 1990; Thiel *et al.*, 1991b) y a la asociación con la incidencia de cáncer esofágico en la región de Transkei, Sudáfrica (Sydenham *et al.*, 1990b). Los desordenes en animales son usualmente relacionados con maíz contaminado molido, el cual con frecuencia contiene una proporción 10 mayor de fumonisinas que los niveles encontrados en el grano de maíz entero.

4.2. Leucoencefalomalacia equina (LEME).

El síndrome se caracteriza por la presencia de lesiones necróticas licuefactivas en la materia blanca del cerebro. Esta enfermedad fatal aparentemente se presenta solo en equinos. La leucoencefalomalacia equina se reportó desde el siglo XIX y se consideró de presentación esporádica. En 1902 la LEME fue producida experimentalmente mediante la alimentación con maíz mohoso obtenido de un brote en campo presente en Kansas. La enfermedad fue conocida como "contaminación del maíz mohoso", sin embargo, se fracasó en la identificación del hongo responsable (Riley *et al*, 1993b).

El establecimiento del agente causal de la enfermedad fue realizado por Wilson & Marapont en 1971, con el aislamiento de *F. verticillioides* como el contaminante predominante del maíz mohoso causante de numerosos casos de LEME y con la reproducción del síndrome mediante la alimentación con el material contaminado con el hongo.

Después del aislamiento de las fumonisinas y la identificación de sus estructuras Marasas *et al*, en 1988 reprodujeron el síndrome en caballos mediante la administración intravenosa de fumonisina B_1, lo cual se realizó evitando la hepatotoxicidad. Posteriormente se reprodujo la enfermedad con el suministro de FB_1 con tubo gástrico, monitoreando la toxicidad hepática (Kellerman *et al*, 1990).

Los investigadores han sugerido que altas dosis de fumonisinas inducen hepatotoxicidad fatal con lesiones leves en cerebro, mientras que dosis bajas causan hepatotoxicidad moderada y severas lesiones en cerebro. Sin embargo, se han presentado signos en el sistema nervioso central y lesiones hepáticas en ausencia de parámetros elevados en suero, así como frecuente presentación de leucoencefalomalacia equina con significativos daños en hígado en caballos alimentados con dietas contaminadas naturalmente con niveles bajos de fumonisinas (Wilson *et al*, 1990).

La dosis mínima de fumonisinas que causa LEME permanece sin ser determinada. Es claro que los caballos son la especie más sensible a los efectos agudos de estas micotoxinas. Mientras no exista una guía oficial que disponga de los niveles de fumonisinas considerados de riesgo, la Asociación Americana de Diagnóstico Veterinario del Comité de Micotoxinas recomienda que alimentos que contengan niveles de fumonisinas mayores de 5 μg/g no deben suministrarse a caballos u otros equinos (Thiel *et al.*, 1992).

Investigaciones realizadas en México reportan principalmente estudios anatomopatológicos de los brotes que se han presentado en los estados de México y Oaxaca, encontrándose lesiones en sistema nervioso central similares a los reportado previamente, el cuadro clínico observado en caballos se caracterizó por anorexia, adipsia, ceguera, parálisis glosofaringea, incoordinación marcada, postración y muerte entre 24 a 48 horas (Sánchez, 1987).

Las concentraciones de fumonisinas que se encontraron en los análisis realizados en Oaxaca en el alimento procedente de un brote de leucoencefalomalacia fueron de 1-10 μg de FB1/g de muestra, considerándose los niveles presentes responsables de la muerte de los animales (García, 1995).

4.3. Edema pulmonar porcino (EPP).

Esta inusual enfermedad en cerdos se caracteriza por recumbencia y muerte. A la necropsia se encuentra severo edema pulmonar e hidrotórax. En 1989-1990 se reportaron brotes de edema pulmonar porcino en diferentes partes de Estados Unidos de norte América (Colvin & Harrison, 1992; Osweiller *et al*, 1992; Ross *et al*, 1991). En el maíz obtenido de granjas donde murieron cerdos con EPP, se encontró *F. verticillioides* como el contaminante predominante (Harrison *et al*, 1990).

La alimentación en cerdos con material cultivado con *F. verticillioides* produjo EPP al menos en un estudio (Osweiller *et al*, 1992), desde el reporte de Kriek *et al.*, en 1981. Sin embargo, la asociación entre *F. verticillioides* y el edema pulmonar porcino parece ser fuerte, especialmente desde que la FB_1 purificada demostró producir la enfermedad mediante la administración vía intravenosa (Harrison *et al*, 1990; Haschek *et al*, 1992; Osweiller *et al*, 1992). También el consumo de alimento contaminado naturalmente con fumonisinas a dosis de 175 μg/g durante 14 días provocó EPP y dosis >23 μg/g ocasionaron hepatotoxicidad en los cerdos (Riley *et al*, 1993b).

4.4. Toxicidad en pollos de engorda.

La implicación de toxinas de *F. verticillioides* en brotes de enfermedades en granjas ha sido controversial por mucho tiempo. La presencia de este hongo en el maíz se consideraba un condición benigna no asociada con toxicidad en pollos, sin embargo, en diversos estudios en los cuales maíz cultivado con el hongo

proporcionado como alimento en aves, demostró la presencia de efectos adversos. En pollo de engorda alimentado con material cultivado con *F. verticillioides*, causó depresión en la ganancia de peso, incremento en la conversión alimenticia y anormalidades del esqueleto. Los patos fueron más sensibles que los pollos y pavos a *F. verticillioides* variedad subglutinans, pero las tres especies desarrollaron degeneración del corazón e hígado (Engelhardt *et al*, 1989). Otros estudios han confirmado inmunosupresión en gallinas (Chu *et al*, 1988, Marijanovic *et al*, 1991).

Desde el descubrimiento de las fumonisinas, diversos investigadores han intentado correlacionar los niveles de estas micotoxinas con la toxicidad en pollos. El rango de las concentraciones de fumonisinas en el alimento en estos estudios fue de 75 a 525 μg/g. La toxicidad notoria (decremento del consumo de alimento y en la ganancia de peso, diarrea, elevada actividad enzimática en suero, incremento de peso del hígado y riñón, necrosis hepática y raquitismo) fue observada a dosis superiores a 150 μg/g, observándose efectos sutiles (elevación en la relación esfingosina:esfingonina) a 75 μg/g (Weibking *et al*, 1993).

4.5. Hepatosis y nefrotoxicidad en roedores.

Las investigaciones primarias establecieron que el hígado es un órgano blanco de *F. verticillioides* en muchas especies, incluyendo las ratas (Norred & Voss, 1994). Estudios posteriores confirmaron que este hongo es también hepatotóxico en ratones (Voss *et al,* 1992). A través de varias investigaciones conducidas en Sudáfrica se descubrió que no todas las cepas de *F. verticillioides* son hepatotóxicas bajo condiciones agudas o subcrónicas (Gelderblom *et al*, 1988). Voss *et al*, (1992) agrega que no todas las cepas son hepatocarcinogénicas, además indica que parece que existe correlación positiva entre la hepatotoxicidad aguda/subcrónica y el potencial de la actividad promotora de cáncer de varias cepas de *F. verticillioides*.

Kriek *et al,* (1981) describen nefrosis en ratas expuestas subcrónicamente a material cultivado con *F. verticillioides*. Las lesiones se desarrollaron previo a la hepatotoxicidad, la cual fue reversible (dentro de 6 semanas) aún cuando continuó la exposición al material cultivado, por lo que se consideró de poca importancia toxicológica. Voss *et al,* (1989, 1992) han encontrado consistentemente reducción en el peso de los riñones, incremento de la creatinina en suero y nefrosis en ratas alimentadas en forma natural con maíz contaminado así como con dietas contaminadas con niveles de 20-150 μg/g de FB_1 y cantidades menores de FB_2 durante 4 semanas, especulando que la FB_1 fue nefrotóxica.

Típicamente las lesiones subcrónicas en hígado consisten en necrosis celular, la cual aparece aleatoriamente en los lóbulos; vacuolización citoplasmática hepatocelular; variación en el tamaño del núcleo y en las propiedades de tinción; picnocitosis, fibrosis y proliferación de los conductos biliares (Gelderblom *et al*, 1988). La exposición crónica resulta en franca cirrosis, carcinomas hepatocelulares, algunos de los cuales son metastásicos, además de colangiofibrosis y colangiocarcinomas (Gelderblom *et al*, 1991).

El mecanismo de carcinogenicidad de las fumonisinas no ha sido descrito. Las evidencias indican que la FB_1 no es genotóxica (Gelderblom *et al*, 1991; Norred *et al*, 1992), que posee pobre actividad de iniciación, sin embargo actúa como efectivo promotor del cáncer hepático tanto en ratas inducidas con dietilnitrosamina como en ratas no inducidas. Gelderblom *et al*, (1993) compararon la toxicidad y la actividad iniciadora de las FB_1, FB_2 y FB_3, concluyendo que los tres isómeros causan efectos hepatotóxicos similares, aunque la FB_3 parece ser la menos tóxica.

4.6. Cáncer esofágico humano.

En algunas regiones del mundo la incidencia del cáncer esofágico excede la presentación "normal" considerada de 5 casos por cada 100,000 habitantes. Transkei, Sudáfrica ha sido la región más extensamente estudiada (Marasas *et al*, 1981), con un rango de 50-200 casos por cada 100,000 habitantes. En esta región el maíz representa la base de la alimentación incluyéndose una cerveza fabricada de maíz y una bebida fermentada no alcohólica (Segal *et al*, 1988).

La contaminación del maíz con *F. verticillioides* y fumonisinas en áreas de alta incidencia de cáncer esofágico fue estadísticamente mayor que la encontrada en las áreas de Transkei con baja incidencia (Rheeder *et al*, 1992). Los niveles de fumonisinas encontrados en el área de alta incidencia fueron de 44 $\mu g/g$ de FB_1. En un estudio más detallado se comparó la presencia de las diferentes especies del género *Fusarium* y la contaminación por fumonisinas y otras micotoxinas, tanto en maíz mohoso como en aparentemente sano así como en áreas de alta y baja incidencia de cáncer esofágico (Sydenham *et al*, 1990b).

En las áreas de alta incidencia, *Fusarium verticillioides*, fue la especie predominante y tanto el maíz mohoso como el "sano" tuvieron altos niveles de fumonisinas. Los estudios ciertamente implican a las fumonisinas como agentes responsables del cáncer esofágico, sin embargo se requieren otras investigaciones epidemiológicas. El cáncer esofágico también se presenta con alta incidencia en algunas regiones de China (Yang, 1980; Yoshizawa *et al.*, 1994), Iran (Kmet & Mahboubi, 1972) y Charleston, área de Carolina del sur, Estados Unidos (Norred & Voss, 1994).

Los estudios con animales de laboratorio alimentados con cultivos de *F. verticillioides* o fumonisinas no mostraron lesiones cancerosas o precancerosas en esófago (Gelderblom *et al*, 1991; Voss *et al*, 1989). En un estudio realizado en China, pudieron observarse cambios cancerosos en el pre-estómago de ratas

alimentadas con maíz contaminado con *F. verticillioides* durante 554 a 701 días (Li *et al*, 1980). Estas lesiones fueron observadas sólo en 4 de 31 hembras. Sin embargo hasta el momento no existe un modelo animal que apoye la teoría que el hongo puede estar relacionado con el cáncer esofágico humano. Otros factores como las nitrosaminas u otros agentes carcinogénicos pueden estar contribuyendo en el incremento de cáncer esofágico, incrementando la actividad promotora de cáncer de las fumonisinas (Norred & Voss, 1994).

Un estudio realizado con monos Vervet, los cuales recibieron alimento contaminado con *F. verticillioides* y fumonisinas mostró la posibilidad que las micotoxinas estuvieran involucradas con otras enfermedades de humanos. En dicho estudio se encontró respuesta aterogénica, relacionada con una respuesta hipercolesterolémica, la cual se presentó con la alimentación de una dieta que contenía 5 % de maíz contaminado con *F. verticillioides*. Los niveles de fumonisinas presentes en la dieta fueron de 209 a 547 μg/ kg de peso vivo. También se encontró en los monos evidencias de daño hepático (elevada actividad de la aspartato transaminasa), sugiriendo los autores que la respuesta aterogénica fue secundaria al efecto hepatotóxico del hongo, sin embargo estos estudios han intrigado debido a la alta incidencia de ateroesclerosis en la región norte de China donde la alimentación se basa en el maíz no así en el sur de China, donde la dieta se basa en arroz (Chang *et al*, 1991).

Los efectos tóxicos de la contaminación de maíz con *F. verticillioides* en el ganado y los posibles efectos en humanos representan un serio riesgo al desarrollo económico de productores de maíz y a la industria maicera. Muchos trabajos se realizan para determinar los niveles de fumonisinas que representan riesgos de salud, así como se requieren el conocimiento de las formas de prevenir la formación de fumonisinas y destoxificar una vez contaminado el alimento.

5. MECANISMO DE ACCIÓN Y TOXICIDAD DE LAS FUMONISINAS

5.1. Introducción.

Las fumonisinas son inhibidores de la N-aciltransferasa esfingonina (esfingosina) *in vitro*, y exhibe inhibición de tipo competitivo con respecto a ambos substratos de la enzima (esfingonina y acil-CoA). La remoción de los ácidos tricarboxílicos de la fumonisina B_1 reduce la potencia al menos 10 veces; y la fumonisina A_1 se inactiva. Estudios con diversos tipos de células (hepatocitos, neuronas, células de riñón, fibroblastos, macrófagos y células de plantas) han demostrado que la FB_1 no solo bloquea la biosíntesis del complejo esfingolípido, sino también causa acumulación de esfingonina. Parte de esfingonina es metabolizada a 1-fosfato y degradada a hexadecanal y fosfato etanolamina, el cual es incorporado dentro del fosfatidiletanolamina. La esfingonina es también liberada de las células y debido a esto aparece en sangre y orina, por lo que es usado como biomarcador de exposición. La acumulación de estos compuestos bioactivos así como la reducción del complejo esfingolípido pueden ser la causa de la toxicidad y quizás de la carcinogenicidad de las fumonisinas (Merril *et al.*, 1996).

5.2. Alteración del Metabolismo de Esfingolípidos.

a) Evidencias *In vitro.*

Los estudios sobre la cinética de la biosíntesis de *novo* de esfingolípidos fueron conducidos mediante la incorporación de serina o ácidos grasos radioactivos dentro de complejos de esfingolípidos de cadena larga (esfingomielina, glicoesfingolípidos, etc) La primera evidencia de que las fumonisinas interferían en el metabolismo de esfingolípidos se observó en hepatocitos primarios de ratas (Wang *et al*, 1991), demostrándose que las fumonisinas B_1 y B_2 inhibían la incorporación de serina (^{14}C) dentro del ácido hidrolizado de la molécula de esfingosina. La IC_{50} (concentración inhibitoria) de la FB_1 para la inhibición de la

biosíntesis de novo de esfingosina en los hepatocitos fue de 0.1 μM, indicando que la FB_1 y FB_2 fueron potentes inhibidores en la ruta de *novo* para la biosíntesis de esfingolípidos. Estudios posteriores demostraron que las FB_3, hidrolizados de FB_1 y las toxinas AAL fueron también inhibidores (Merril *et al*, 1993).

En animales el término "biosíntesis de esfingolípidos de *novo*" se refiere al paso enzimático que ocurre en el retículo endoplásmico y empieza con la condensación de serina y palmitol coenzima A (Co-A) para formar alfa-quetoesfingonina y dar lugar a la formación de ceramida (N-acilesfingosina), la cual se forma por la reducción del dihidroceramida (N-acilesfingonina).

En la ruta biosintética de novo la enzima esfingonina N-aciltransferasa (ceramida sintetasa) es inhibida por las fumonisinas y las toxinas AAL (Merril *et al*, 1993; Wang *et al*, 1991). Esta enzima cataliza la unión de un ácido graso de la cadena larga de la base esfingoide, esfingonina para formar dihidroceramida. La misma enzima tiene la habilidad para reacilar esfingosina, la cual es generada por la hidrólisis de complejos esfingolípidos (Figura 3) por lo tanto el nombre colectivo de sintasa ceramida (Riley *et al*, 1994 b).

Debido a que la inhibición de la enzima esfingonina N-aciltransferasa ocurre en forma aparente por competición tanto por la esfingonina como por la estearoil CoA, se hipotetizó que las fumonisinas interactuaban con los sitios de unión de ambos substratos, sin embargo la inhibición no fue reversible sugiriéndose que las fumonisinas se unen fuertemente a la enzima (Merril *et al.*, 1993).

METABOLISMO NORMAL DE ESFINGOLIPIDOS

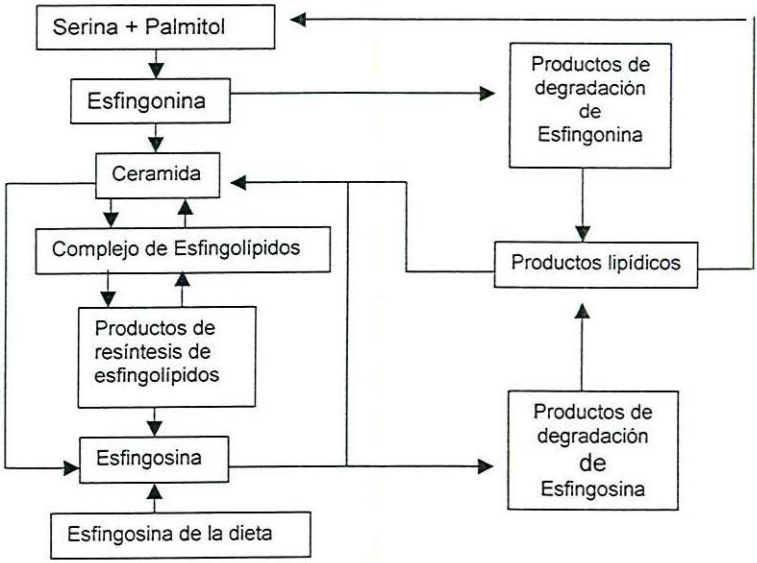


Figura 3. Diagrama de flujo que muestra los principales aspectos del metabolismo de esfingolípidos como se cree que ocurre en células sanas de mamíferos (no se presentan algunos intermediarios para simplificar la presentación). (Riley *et al*, 1994)

La esfingosina es un aminoalcohol de larga cadena insaturada y es la base esfingoide más frecuente de los esfingolípidos de mamíferos. En los hepatocitos primarios de ratas, durante el tiempo de la incorporación de la serina (^{14}C) dentro de la esfingosina, el complejo esfingolípido fue bloqueado por la fumonisina B_1. La esfingonina es similar a la esfingosina excepto porque en ésta no se presenta doble ligadura en el enlace 4 (base esfingoide saturada). El único esfingolípido en células de mamíferos que contiene esfingonina es la dihidroceramida (N-acilesfingonina), la cual es formada por N-acilación de la esfingonina (Riley *et al*, 1994 a).

Puesto que la presentación de esfingosinas libres en células de mamíferos es siempre producto del catabolismo de esfingolípidos y la presencia de esfingoninas libres son intermediarios de la ruta biosintética de *novo* de esfingolípidos, ambos grupos esfingoides se encuentran siempre en concentraciones bajas en células sanas. Por lo que elevadas concentraciones pueden afectar el crecimiento de las células y dañar su integridad (Merril *et al*, 1993; Merril Jr., 1991), lo que ha sido asociado con defectos genéticos en la biosíntesis de esfingolípidos.

En resumen hasta ahora se ha demostrado que algunas de las consecuencias de la inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa por las fumonisinas en estos modelos celulares son: a) inhibición de la biosíntesis de novo de esfingosina; b) acumulación de esfingonina libre (Wang *et al*, 1991; Yoo *et al*, 1992); c) disminución del complejo esfingolípido (Merril *et al*, 1993; Wang *et al*, 1991); d) incremento de los productos de degradación por el catabolismo de las bases esfingoides (Merril Jr., 1993; Merril *et al*, 1993); e) incremento de productos lipídicos derivados del aumento de productos de degradación de las bases esfingoides (Smith & Merril, Jr., 1993) y f) incremento de esfingosina libre (Merril *et al*, 1993; Yoo *et al*, 1992) posiblemente por la inhibición de la reacilación de la esfingosina derivada tanto de la dieta o del catabolismo de complejos de esfingolípidos (Figura 4).

La inhibición de la sintasa ceramida por fumonisinas además de causar acumulación de esfingonina produce en menor proporción fosforilación y separación de esfingonina (Merril, Jr. *et al.*, 1993).

En la mayoría de los estudios realizados, la concentración de esfingonina se incrementa significativamente cuando las célula son tratadas por fumonisinas, por ejemplo, los niveles de esfingonina se incrementan 110 veces (aprox. 1 nmol/mg de proteína) cuando hepatocitos de rata se incubaron con un μM de FB1 durante cuatro días (Wang *et al.*, 1991).

Estudios adicionales han mostrado estimulación de la síntesis de ADN en células Swiss 3T3 (Schroeder *et al*, 1994), efecto mitogénico de la FB_1, lo que apoya la hipótesis de que la inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa y la resultante alteración del metabolismo de esfingolípidos son los eventos primarios que conducen en cascada a otros eventos bioquímicos que alteran la regulación celular y dañan su integridad (Riley *et al*, 1994a).

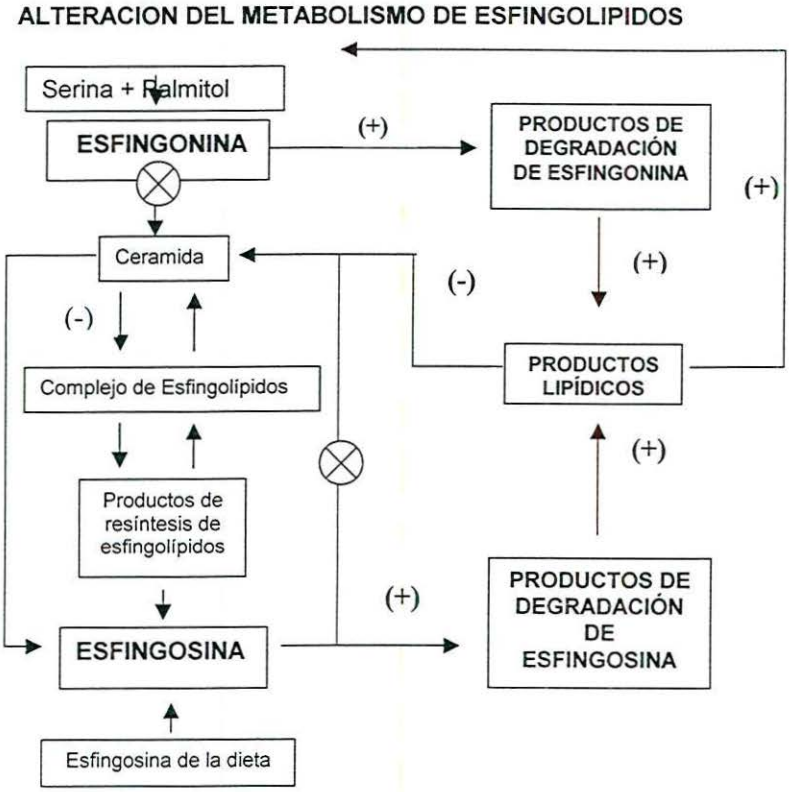


Figura 4. Diagrama de flujo que muestra la alteración del metabolismo de esfingolípidos en las células de mamíferos expuestas a fumonisinas. El blanco bioquímico primario de inhibición de la esfingonina (esfingosina) N-aciltransferasa, se indica con ⊗. El resultado de la alteración en el metabolismo de esfingolípidos se aprecia por el aumento o decremento de tamaño de los recuadros.

b) Evidencias *In vivo*.

Debido que en cultivos celulares la relación de esfingosina libre con esfingonina libre demostró ser un marcador dimensional de la alteración del metabolismo de esfingolípidos por las fumonisinas, se hipotetizó que la alteración en el metabolismo de esfingolípidos en hígado (u otros órganos) de animales que consumen fumonisinas o alimentos contaminados con la micotoxina pudiera ser detectada por el incremento de la relación esfingonina:esfingosinas libres en suero. Esta hipótesis fue probada en una serie de estudios utilizando suero y tejidos obtenidos de ponies, cerdos, pollos y ratas. El primer estudio (Wang *et al*, 1992) se realizó con muestras de suero de ponies alimentados con material que contenía FB_1, observándose incremento en la relación de los grupos esfingoide libres. El complejo esfingolípido disminuyó en suero. Observándose decremento en dicha relación al retirar el consumo de alimento.

En reciente estudio dietas formuladas con material cultivado con *F. proliferatum*, conteniendo predominantemente FB_2 o FB_3 a 75 μg/g, se encontró que las dietas que contenían FB_2 causaron LEME y que la dietas con FB_3 no fueron tan potentes como las FB_1 y FB_2 (Ross *et al*, 1994). Los cambios en suero respecto a la relación de los grupos esfingoides apoyaron dichas conclusiones, sin embargo, mientras que la FB_3 no causó LEME o cualquiera indicación de hepatotoxicidad o nefrotoxicidad, la concentración de esfingonina y la relación de los grupos esfingoides fue significativamente elevada en suero, hígado y riñones de los ponies. El incremento detectado en suero y tejidos de ponies alimentados con dietas que contenían FB_2 fue mayor que el observado en los ponies alimentados con FB_3. Similares estudios se han conducido en cerdos (Haschek *et al*, 1993; Riley *et al*, 1993a).

Basados en los estudios realizados en cerdos, se hicieron las siguientes conclusiones: a) la alteración de la biosíntesis de esfingolípidos en hígado, pulmones y riñones ocurre a baja concentraciones de fumonisinas; b) la elevación

de esfingonina libre, de la relación de los grupos esfingoides y la disminución del complejo esfingolípido ocurre antes de que se presenten cambios bioquímicos en suero que indican que el daño tisular es elevado; y c) la FB_1 pura y dietas de maíz contaminadas naturalmente con fumonisinas, ambas alteran la biosíntesis de esfingolípidos principalmente en hígado, pulmones y riñones, siendo menor el daño en otros tejidos (cerebro, páncreas, nódulos linfáticos y músculo esquelético) (Haschek *et al*, 1993).

En ratas Sprague Dawley alimentadas con dietas conteniendo FB_1 pura por 4 semanas se observó estrecha correlación entre la severidad de los cambios estructurales observados en hígado y riñón y la elevación de esfingonina libre y la relación esfingonina:esfingosina (Riley *et al*, 1994a).

Otros estudios in vivo con pollos (Weibking *et al*, 1993), peces y conejos dosificados intravenosamente con fumonisinas o consumiendo dietas contaminadas mostraron similares hallazgos. A fin de entender como la alteración del metabolismo de esfingolípidos por las fumonisinas puede conducir a las enfermedades, es necesario comprender el papel que juegan los esfingolípidos en la función celular.

Parte de la esfingonina que se acumula en células tratadas con fumonisinas escapa de las células y aparecen en sangre. Como un ejemplo de los cambios típicos que ocurren, se observó en un pony que consumió dietas conteniendo 44 ppm de FB1 incremento de 2.7 veces de enfingonina (día 2), de 4.5 veces (día 7) y elevación en esfingonina de 13 veces y de esfingosina 2 veces al día 10. El día 10 se observó incremento 7 veces mayor de la actividad de la transaminasa en suero, lo que indicó un daño celular significativo. Hasta esta etapa, la elevación de esfingonina en suero es reversible y cuando el pony rechaza el alimento contaminado, la cantidad de esfingonina en suero retorna a la normalidad. La reanudación del consumo de alimento contaminado mostró incremento en esfingonina, observándose en el animal la presencia de signos clínicos de LEME y

requiriendo eutanasia al día 45 (Wang *et al.,* 1992); por lo tanto los niveles de esfingonina en suero pueden ser utilizados para detectar el consumo de fumonisinas, la observación temprana puede evitar el daño irreversible en el animal.

Los niveles de esfingosina también se pueden elevar (especialmente si hay muerte celular y los lípidos de las membranas retornan rápidamente), la relación esfingonina/esfingosina también puede correlacionarse con la exposición, lo que puede ser un índice de exposición más útil (Riley *et al.*, 1993b)

Estudios similares se han realizado en cerdos (Riley *et al.*, 1993a), pollos, (Weibking, *et al.*, 1993), ratas (Riley *et al.*, 1994 a) y otros animales.

5.3. Posibles mecanismos de toxicidad de las fumonisinas.

La alteración de la biosíntesis de esfingolípidos pudiera ser predictiva para detectar efectos en las células debido a que estos compuestos juegan un papel importante en la estructura de las membranas y en lipoproteínas, en la comunicación célula-célula, interacciones entre células y en la matriz extracelular, regulación en los receptores del factor de crecimiento y como mensajeros secundarios en un amplio rango de factores que incluyen el factor de necrosis tumoral, interleucina 1 y el factor de crecimiento neuronal (Merril *et al.*, 1996).

Con base en el conocimiento actual acerca de algunos de los sistemas que se ha descubierto que son regulados por esfingolípidos, diversos mecanismos pueden ser propuestos a causa de la alteración del metabolismo de esfingolípidos por las fumonsinas, los cuales pueden ser los responsables de la toxicidad y carcinogenicidad de estas micotoxinas (Figura 5).

Dos de las explicaciones más aceptadas acerca de la muerte celular después de la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos por fumonisinas, son:

1) La acumulación de esfingonina libre (y sus posibles metabolitos, tales como 1-fosfato) es inhibidora de crecimiento y citotóxica para las células. Se conoce que bases de cadena larga (esfingoides) son inhibidoras de crecimiento y citotóxicas, por lo tanto la acumulación de esfingonina (y algunas veces esfingosina) puede ocasionar la muerte de la célula. El blanco celular que explique los efectos de las bases de cadena larga se desconoce, sin embargo existe un gran número de candidatos. Dichas bases han demostrado inhibir la proteína C-kinasa, activar la fosfolipasa D y activar o inhibirotras enzimas que actuan en las rutas de lípidos, tales como la fosfatasa ácido fosfatídica y la fosfolipasa C, inhibir la ATPasa de Na^+/K^+, inducir la la defosforilación de la proteína retinoblastoma, inducir la eliminación de Ca^{2+} del almacén intracelular (aparentemente vía esfingosina 1-fosfato) y afectar un gran número de sistemas regulatorios de otras celulas (Merril *et al.*, 1993a). Además, se ha observado que la esfingosinainduce apoptosis en timocitos y neutrofilos.

2) La pérdida de la biosíntesis del complejo esfingolípidos pudiera esperarse que altere el desarrollo celular y ocasionar la muerte celular, con base en hallazgos de mutación en la serina palmitoiltransferasa, enzima inicial de la biosíntesis de esfingolípidos (Merril, Jr. *et al.*, 1996).

Existen pocos estudios que han intentado relacionar los efectos de las fumonisinas con el desarrollo celular. Yoo et al. (1992), han mostrado una estrecha asociación entre la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos en células LLC-PK1 (linea celular del epitelio renal) y la inhibición del crecimiento y toxicidad de FB1. En estudios más recientes, se ha demostrado estrecha relación entre la acumulación de esfingonina en las células, la reducción del complejo esfingolípido y la muerte

celular , medida por la reducción de proteína celular y la liberación de lactato deshidrogenasa dentro del medio.

Investigaciones con neuronas del hipocampo de ratas han demostrado que las fumonisinas inhiben la extensión neuronal y la formación de sinapsis, lo cual pudo evitarse por la adición de ceramida a las células (Harel & Futerman, 1993). La habilidad para restaurar la función normal por la incorporación de ceramida muestra que estos efectos de las fumonisinas son debidos por la pérdida de la biosíntesis de esfingolípidos.

En otro estudio reciente, se ha examinado el efecto de la FB_1 sobre la función protectora de las células endoteliales. En dicho estudio, células endoteliales a partir de arterias pulmonares de cerdo, se cultivaron sobre filtros de microporo y se determinó el efecto de FB_1 (20 a 50 μM) en el movimiento de la albúmina a través de la monocapa. La inclusión de FB1 dobló la proporción de albumina transferida sin ningún cambio aparente en el número de células viables, medido por la exclusión del tripano azul y por morfología. Por lo que estos cambios pudieron deberse a cambios en la interacción célula-célula, por la pérdida del complejo esfingolípido o por la acumulación de esfingonina o ambos. Los hallazgos en las células endoteliales, pueden explicar el daño vascular observado en cerdos (Casteel et al., 1994) y puede jugar un papel importante en la extravasación de fluidos en pulmones en el síndrome del edema pulmonar porcino. Esto puede también contribuir al edema y a las hemorragias perivasculates que se han observado en cerebro de caballos con leucoencefalomalacia equina (Marasas *et al.*, 1988).

5.4. Posibles mecanismos de las fumonisinas como inductores de cáncer.

Existen diversos mecanismos que pudieran explicar el efecto cancerígeno de las fumonisinas. La carcinogenicidad frecuentemente se define como la presentación

de tres fases distintivas: iniciación (cambios genéticos), promoción (expansión clonal de células iniciadoras) y progresión (conversión maligna) (Harris, 1991).

Químicamente los agentes carcinógenos se han clasificado como no genotóxicos (que no causan daño al ADN), indirectamente genotóxicos (aquellos que causan daño en rutas celulares y que posteriormente dañan el ADN) y directamente genotóxicos (de acción cancerígena directa). Los agentes no genotóxicos pueden actuar como cancerígenos pudiendo ocasionar el desarrollo de cáncer en los diferentes estados.

Las fumonisinas, son agentes no genotóxicos (Gelderblom *et al*, 1991), sugiriéndose que el mecanismo de incremento de riesgo de cáncer ocurre por aumento en la proliferación celular producida por efecto mitogénico a células blanco o por proliferación celular regenerativa subsecuente a la citotoxicidad (Cohen & Ellwein, 1990). Aunque esta propuesta no es aceptada universalmente, provee los medios de entender la carcinogenicidad de las fumonisinas.

Agentes no genotóxicos pueden también actuar disminuyendo la reparación del ADN o durante la replicación del ADN, o bien inhibiendo las rutas por las cuales se detiene el ciclo celular o se induce la apoptosis en respuesta del daño acumulado del ADN (Weinstein, 1991).

Existen diversas maneras por las cuáles las fumonisinas pueden ocasionar carcinogénesis por la alteración del metabolismo de esfingolípidos (Tabla 5), estos incluyen la activación de un factor de crecimiento epidérmico, receptor kinasa, probablemente vía activación mitogénica de la proteína kinasa (MAP kinasa); el control de calcio intracelular, incremento de AP-1 (un paso temprano del crecimiento de algunos tipos de células, *inter. alia*).

Tabla 5. Posibles mecanismo de carcinogenicidad de las fumonisinas.

Posibles mecanismos de promoción de carcinogenicidad vía alteración del metabolismo de esfingolípidos:
Activación de EGF/MAP kinasa
Activación de fosfolipasa D y/o inhibición de la fosfohidrolasa ácido fosfatídica
Eliminación de calcio intracelular
Activación de AP-1
Citotoxicidad de células normales
Pérdida de regulación de la diferenciación
Pérdida de regulación de apoptosis
Pérdida de mediadores lipídicos de TNF

EGF/MAP kinasa: Factor receptor de crecimiento epidérmico/proteína mitogénica

AP-1: paso temprano del crecimiento de algunas células (*inter alia*)

6. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETECCIÓN DE FUMONISINAS.

6.1. Introducción.

La alta frecuencia de fumonisinas en productos de maíz y sus implicaciones a la salud han conducido al desarrollo de técnicas analíticas precisas para la detección de estas micotoxinas. Entre las principales, se encuentran la cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y más recientemente las técnicas desarrolladas por anticuerpos mono y policlonales (cromatografía por inmunoafinidad y ELISA).

6.2. Preparación de las muestras.

En la actualidad se citan dos métodos de extracción mediante solventes polares (metanol/agua o acetonitrilo/agua) ; seguido de limpieza mediante columna de intercambio iónico (SAX) o vía columna C_{18} de fase de reversa Sep-Pak (Stack, 1998).

Para la detección de las fumonisinas mediante cromatografía de líquidos o cromatografía de capa fina se requiere derivatización con agentes fluorescentes como fluorescamina, OPA (o-phthaldialdehido) o el NAD (2,3 dicarboxialdehido naftaleno), mientras que para cromatografía de gases-espectometría de masas (CG-EM) se requiere la hidrólisis de bases, a fin de remover los grupos de ácidos tricarboxílicos y la derivatización de grupo amino para aumentar la volatilización. La ventaja del método de CG-EM, es que combina la cuantificación de la fumonisina con la confirmación estructural, desafortunadamente se requiere de tiempo considerable para su análisis y de equipo costoso (Rothinghaus *et al*, 1992; Tejada *et al*, 1994).

El método más usual para la detección de fumonisinas en alimentos es mediante cromatografía de líquidos, el cual permite la separación de las fumonisinas FB_1, FB_2, y FB_3 en 16 minutos mediante un sistema de solventes y permite un límite de detección de 50 ng/kg (Rice & Frank 1994; Sydenham *et al*, 1992b).

El método de cromatografía de capa fina tiende a separar e identificar eventualmente las fumonisinas, pero es de escasa sensibilidad, siendo el límite de detección de 50 μg/kg (Rothinghaus *et al*, 1992).

Con el adviento de la tecnología de anticuerpos monoclonales y policlonales en aplicaciones analíticas, particularmente en el terreno de las micotoxinas, se hace posible chequeos rápidos y confiables de contaminación con métodos de bajo costo. Se ha desarrollado para la inspección de alimentos, la técnica ELISA (Ensayo Inmunofluorescente de enzima ligada) y el método de Inmunocromatografía (Azcona *et al*, 1992).

La técnica de ELISA consiste en poner en contacto el anticuerpo específico de la toxina presente en la superficie de la microcelda con la toxina extractada de la muestra, mezclar con la solución del conjugado (toxina marcada químicamente o conjugada con la enzima), donde compiten por los sitios de acoplamiento y después del período de incubación, la toxina y el conjugado libres son lavados para posteriormente agregar el substrato y obtener el cambio de color por efecto del conjugado. A mayor conjugado ligado a anticuerpos mayor coloración (Tejada *et al*, 1994). Entre los métodos que utilizan anticuerpos se incluyen las técnicas inmunoenzimáticas (Agri-Screen y Veratox de Noegen), las cuales se basan en la técnica de ensayo inmunoabsorbente mediante enzima ligada (Ware, 1994).

Investigaciones realizadas para la detección de fumonisinas en productos nixtamalizados han mostrado interferencia por el calcio presente en las tortillas. Stack en 1998 analizó la presencia de fumonisinas en tortillas utilizando columnas para extracción y limpieza C_{18} fase de reversa y derivatización con o-

phaldialdehido y 2-mercaptoetanol, obteniendo un porcentaje de recuperación de 86.5% para FB_1 y de 82.6% para HFB_1. Los contenidos de FB_1 e HFB_1 en las tortillas obtenidas en la frontera de Texas-México fueron de 187 y 82 ng/g respectivamente. En masa fueron de 262 y 64 ng/g. Los resultados encontrados en el estudio mostraron que la FB_1 y su hidrolizado se encuentran presentes en las tortillas consumidas por la población.

6.3. Cromatografía de capa fina (Rottinghaus *et al.*, 1992).

Descripción de la técnica:

1. Se disuelve la muestra seca en un vial con 100 μl de acetonitrilo:agua (1:1 v/v) y 10 μl se aplican a la placa de cromatografía C_{18}, así como 10 μl del estándar de FB_1 en tres diluciones (5,10,100 μg/g) en acetonitrilo:agua (1:1 v/v).
2. El desarrollador (fase móvil) que se aplica a la placa es metanol:cloruro de potasio al 1% (6:4 v/v).
3. Se seca la placa al aire y aplica buffer de borato de sodio al 0.1 M (pH 8-9) seguido de fluorescamina (0.4 mg/mL de acetonitrilo).
4. Un minuto después se aplica acetonitrilo:ácido bórico (6:4 v/v) y seca a temperatura ambiente.
5. La placa se examina bajo luz ultravioleta con longitud de onda de 254 y 366 nm.

6.4. Cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC) modificada por Shephard *et al.* (1990).

Descripción de la técnica:

Extracción y limpieza de la muestra:

1. Se licuan 10 g de la muestra con 50 mL metanol:agua (8:2 v/v) durante 2 minutos y se filtra en papel Whatman No. 4.
2. Se agrega el extracto en la columna Supelclean LC-SAX (Supelco) que separa a las fumonisinas, la cual es acondicionada con 2 mL de metanol y después con 1 mL de agua destilada. Se adiciona 1 mL del extracto de la muestra a la columna LC-SAX.
3. Una segunda columna C_{18}SPE (Supelco) que separa a los hidrolizados de fumonisinas, también acondicionada en forma similar, se adapta fisicamente a la columna LC-SAX para recibir al eluante de la muestra.
4. La columna LC-SAX se lava con 1 mL de agua, agregando el eluante del lavado a la columna C_{18}SPE. Se separan las dos columnas.
5. La columna LC-SAX se lava con 500 μL de metanol, los cuales se descartan y las fumonisinas se eluyen con 1 mL de metanol:ácido acético (9:1).
6. La columna C_{18}SPE se lava con 500 μL de metanol:agua (5:5 v/v), los cuales se descartan y el hidrolizado se eluye con 1 mL de metanol.
7. Los eluyentes se evaporan en viales de 1.8 mL a 60°C y el residuo es disuelto en 100 μL de acetonítrilo:agua (5:5 v/v) previo a la determinación (Scott y Lawrence, 1996).

Preparación del derivatizante, estándares e hidrolizados.

Se prepara el derivatizante O-phthaldialdehido/mercaptoetanol (OPA/MCE) disolviendo 20 mg de OPA en 500 μL de metanol con 2 mL de borato de sodio al 0.05 M, posteriormente se agregan 25μL de MCE. Este solvente es estable por

una semana en la oscuridad. Se debe hacer la derivatización 1 minutos antes de inyectar la muestra en el HPLC.

Las soluciones base de los estándares de FB_1 y FB_2 (Sigma Chemical Co.) se preparan agregando 10 mL de acetonitrilo:agua (2:8 v/v) a 5 mg del estándar. Se hacen diluciones de 10, 5, 3, 1, 0.5 y 0.3 μg/mL de cada estándar, con objeto de obtener los diferentes puntos de cada una de las curvas de calibración.

La hidrólisis de FB_1 y FB_2 según técnica de Thakur y Smith (1996), se realiza preparando los hidrolizados (HFB_1 y HFB_2) a partir de soluciones base de los estándares de FB_1 y FB_2 (10 μg/mL) mezclando 5 mL de la solución base con 5 mL de hidróxido de potasio (KOH) al 1 N, calentando la mezcla en viales cerrados a 70° C durante 1 hora. Después de la limpieza los HFB_1 y HFB_2 se diluyen a 10, 5, 3, 1, 0.5 y 0.3 μg/mL para obtener las curvas de calibración correspondientes. La hidrólisis se detiene mediante acidificación con solución de HCL al 2 N (pH 4.5). La formación de HFB_1 y HFB_2 se debe confirmar por inyección líquida directa en termoespray-espectrometría de masas.

Cuantificación de FB_1, FB_2, HFB_1 y HFB_2.

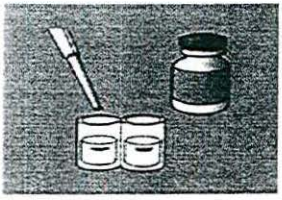
Condiciones del equipo de cromatografía de líquidos (HPLC): Cromatógrafo de líquidos con sistema de bombeo Series 400, Detector de fluorescencia LC-10 e Integrador computarizado LCI-100, Perkin Elmer. Se utiliza una columna Prodigy 5 ODS-2, 250 mm x 4.6 mm x 5 μm de Phenomenex.

Se mezclan 50 μL del derivatizante OPA-MCE a 12.5 μL de muestra en un vial ámbar de 1.8 mL y se espera por un minuto. Una vez derivatizada la muestra se inyectan 30 μL al cromatógrafo de líquidos. La fase móvil es metanol: fosfato de sodio monobásico al 0.1 M (8:2 v/v), ajustado a pH 3.3 con ácido fosfórico a una velocidad de flujo de 1 mL/minuto. Los tiempos de retención son de 7.10-7.76 min (FB_1), 14.3-16.75 min (FB_2); 12.08-14.57 min (HFB_1) y 14.91-15.88 (HFB_2).

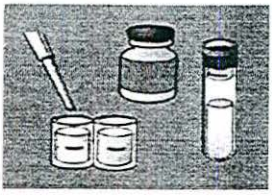
6.5. Técnica de inmunoensayo de ELISA (Fumonisin Quantitative Test Kit, Veratox, de Neogen).

Descripción de la técnica:

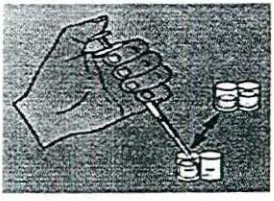
1. Se licuan 50 g de muestra con 250 mL de metanol al 70% durante 2 minutos a alta velocidad.
2. Se filtra el extracto con papel Whatman N° 1 y se colecta 10 mL.
3. Se diluyen 100 μL del extracto de la muestra en los frascos de dilución del kit agitando para homogeneizar.
4. Se colocan 100 μL del conjugado a cada pozo (microceldilla) y posteriormente se agregan 100 μl de la dilución de la muestra y de los estándares.
5. Se trasfirieren 100 μL de la muestra con el conjugado a los pozos recubiertos de anticuerpos.
6. Se incuba a temperatura ambiente por 15 minutos, agitando cada 5 minutos por 30 segundos, sin salpicar el contenido de una celdilla a otra.
7. Después de 15 minutos se elimina el contenido de los pozos y se lava con agua destilada, secando con papel absorbente repitiendo 5 veces el lavado.
8. Se agregan 100 μL del substrato K-azul y se incuba a temperatura ambiente durante 15 minutos.
9. Se detiene la reacción con 100 μL de solución diluida de H_2SO_4 por pozo.
10. Se limpia la base de las microceldillas y se realiza la lectura de la densidad óptica en un Lector de ELISA (EL 301, Biotec), utilizando el filtro de 650 nm. (Figura 6).



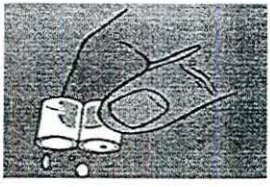
1. Adicionar el conjugado a las celdas.



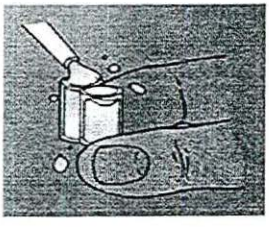
2. Agregar los controles y muestras.



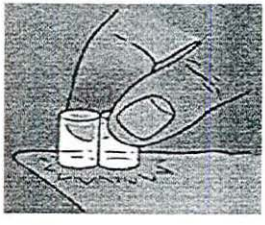
3. Transferir los controles y las muestras a celdas recubiertas con anticuerpos.



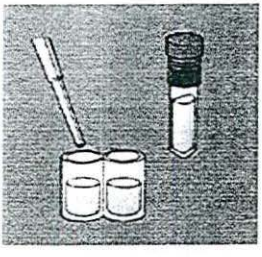
4. Después de incubar 15 min Desechar el líquido de las celdas.



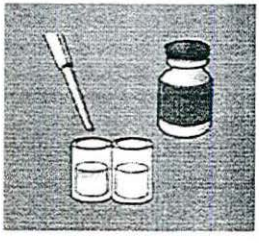
5. Lavar los pocillos 5 veces con agua destilada.



6. Retirar el exceso de agua golpeando fuertemente sobre papel absorbente.



7. Adicionar el substrato e incubar.



8. Agregar la solución bloqueadora, mezclar y leer resultados.

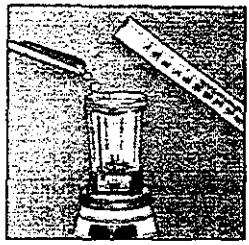
Figura 5. Determinación de fumonisinas por el método de ELISA.

BIBLIOTECA CUCBA

6.6. Cromatografía por inmunoafinidad y detección fluorométrica (Laboratorios Vicam).

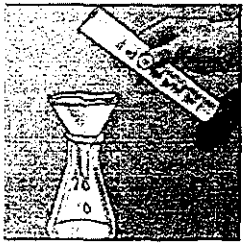
Descripción de la técnica:

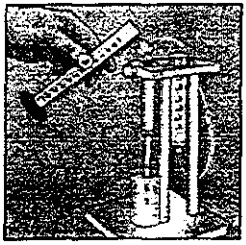
1. Se colocan 50 g de muestra con 5 g de cloruro de sodio en una licuadora.
2. Se agregan 100 mL de metanol al 80% y licua a alta velocidad durante 1 minuto.
3. Se filtra en papel aflautado de poro fino y colecta en un vaso de precipitado.
4. Se diluyen 10 mL de extracto filtrado en 40 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS).
5. Se filtra el extracto diluido con papel de fibra de vidrio y 10 mL del mismo se agregan a la columna de Fumonitest (Vicam).
6. Se lava dos veces la columna con 10 mL de PBS al 0.1%.
7. Se eluyen las fumonisinas con 1 mL de metanol grado HPLC y se colecta el eluante en una cubeta de vidrio para fluorómetro.
8. Se agregan 0.5 mL del derivatizante de O-phthaldialdehído y 0.5 mL de mercaptoetanol. La lectura de la concentración de fumonisinas se realiza a los 4 minutos en el fluorómetro de la serie Vicam (Figura 7).



Extracción: 50 g de muestra con 5 g de NaCl y 100 ml de metanol al 80 %.

Filtración: papel aflautado de poro fino.

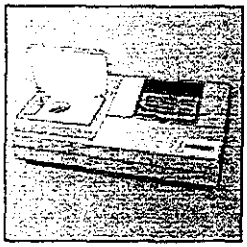




Dilución: 10 mL del extracto y 40 mL de solución amortiguadora PBS se mezcla y filtra en microfibra
Cromatografía de afinidad:
10 mL del extracto de la muestra se pasa a través de la columna a un flujo de 1 a 2 gotas por segundo.

Lavado: con 10 mL de la solución PBS se lava la columna (se repite).

Elución: en tubo se recuperan las fumonisinas con 1 mL de metanol grado HPLC y derivatizan.



Lectura: Insertar el tubo dentro del Fluorómetro serie 4 Vicam previamente calibrado.

Figura 6. Determinación de fumonisinas por cromatografía de inmunoafinidad y detección fluorométrica (Ware *et al.*, 1994).

7. EFECTO DE LOS PROCESOS SOBRE LA ESTABILIDAD DE LAS FUMONISINAS.

7.1. Introducción.

Los estudios que han reportado la presencia de fumonisinas en el maíz y en los productos para consumo humano, muestran altos niveles en el maíz entero así como en productos que se han sometido al menos a procesos mínimos como la molienda. Los productos con un nivel mayor de procesamiento como los cereales hojueleados y de maíz inflado tienden a ser negativos o presentar niveles bajos de fumonisinas. Sin embargo estos resultados deben tomarse con precaución debido a que proceden de estudios con un número limitado de muestras (Bullerman & Tsai, 1994). Existe limitada información respecto al efecto de los procesos sobre la estabilidad de las fumonisinas. Procesos biológicos, químicos y físicos han sido estudiados para evitar la contaminación por fumonisinas en el maíz.

7.2. Tratamientos Biológicos.

Bothast *et al.* (1992) evaluaron la fermentación como medida para evitar la contaminación del maíz por fumonisinas. Encontraron que solo una cantidad limitada de FB_1 fue degradada durante la fermentación del maíz contaminado. La micotoxina en el metanol fue removida por destilación, sin embargo los granos destilados, residuos y solubles derivados de la destilación contenían niveles significativos de fumonisinas, requiriendo detoxificación antes de su utilización en la alimentación animal.

7.3. Métodos Físicos:

Diversos métodos físicos para descontaminación de maíz contaminado con fumonisinas se han investigado. Sydenham et al. (1994) reportaron la reducción

del contenido de fumonisinas en 26-69% por la molienda. Estudios conducidos por Bennett & Richard (1995) en el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica mostraron que el almidón obtenido por molienda húmeda fue libre de fumonisinas, sin embargo el gluten y la fibra presentaron niveles considerables de fumonisinas y requirieron descontaminación antes de su utilización en la alimentación animal.

7.4. Tratamientos Químicos.

Norred *et al.* (1991) encontraron que los tratamientos de amoniación que incluyen variaciones en la presión atmosférica/temperatura ambiental disminuyeron el contenido de *F. verticillioides* pero no la toxicidad de la dieta de ratas. Park *et al.* (1996) reportaron reducción del 79% de fumonisinas en maíz después de la amoniación con alta presión a temperatura ambiente seguido por baja presión y alta temperatura, sin embargo en dicho estudio no se midió la toxicidad del maíz tratado. Sydenham et al. (1991) reportaron que productos de maíz (masa y tortilla) nixtamalizados adquiridos en Sudáfrica y EUA mostraron bajos niveles de fumonisinas. Hendrich et al. (1993) encontraron que los productos tratados con calor e hidróxido de calcio hidrolizaron la FB_1 a cadenas de aminopentol y ácido tricarboxílico. Cuando el maíz fue consumido por ratas, se encontró que la toxicidad no se redujo por el tratamiento.

7.5. Procesos Térmicos:

El calentamiento del maíz y productos derivados presentaron decremento en la eficiencia de extracción por los métodos actuales (Bordson *et al*, 1993; Dupuy *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 1996). Hasta ahora la fumonisina B_1 ha sido considerada como un compuesto estable al calor. Alberts *et al.* (1990) reportó que material cultivado con *F. verticillioides* sometido a ebullición durante 30 minutos seguido por deshidratación a 60°C por 24 horas no presentó cambios o pérdida en los niveles de FB_1. Recientemente Scott & Lawrence (1992) demostraron la

recuperación del 40% de las FB_1 y FB_2 después del calentamiento de maíz a 190°C, no recuperándose a 220°C (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto de la temperatura sobre fumonisinas en harina de maíz (Scott & Lawrence, 1992)

Substrato	Recuperación (%)			
	°C	minutos	FB_1	FB_2
Harina de maíz	22	60	69	65
	22	60	77	79
	190	60	42	38
	220	25	0	0
Harina de maíz + H_2O (1+1)	22	60	39	41
	22	60	63	76
	190	60	17	21
	190	60	23	32

Los niveles de fumonisinas pueden reducirse 50% o más después del calentamiento, pero el substrato permanece tóxico. La toxina posiblemente permanece atada a la matriz del alimento y llega a no ser recuperada, por lo que es muy importante distinguir entre la descomposición y la atadura de la toxina en la matriz del alimento (Bullerman & Tsai, 1994).

Por otra parte los métodos analíticos deben ser capaces de detectar productos hidrolizados de las fumonisinas que permanecen tóxicos en los alimentos como la tortilla. La nixtamalización, proceso térmico-alcalino para la elaboración de la tortilla, remueve la FB_1, pero resulta en la formación de productos hidrolíticos que permanecen tóxicos (Hendrich *et al*, 1993; Sydenham *et al*, 1991), estos productos

hidrolizados son de gran interés ya que algunas investigaciones sugieren que poseen los mismos efectos toxicológicos *in vitro* (Gelderblom *et al*, 1993) y la misma actividad promotora de cáncer hepático *in vivo* (Hendrich *et al*, 1993) que la fumonisina original.

7.6. Proceso de nixtamalización.

La nixtamalización, método tradicional para la elaboración de tortillas, involucra el cocimiento de maíz entero en agua conteniendo 1% de hidróxido de calcio, seguido de un período de reposo. El líquido de cocimiento es descartado y el grano cocido (nixtamal) es lavado para remover el pericarpio y el exceso de calcio. El nixtamal se muele para obtener la masa la cual es preparada y cocida para producir las tortillas (Serna-Saldivar *et al*, 1990). El alto pH del sistema alcalino parece promover la ionización de los grupos hidroxi en el almidón, produciendo ligaduras del almidón con el calcio (Dombrink-Kurtzman & Dvorak, 1999). Este tratamiento puede hidrolizar a la fumonisina B_1 original a hidrolizado de fumonisina B_1 (HFB_1) denominado aminopentol (AP_1) (Figura 8).

La reacción involucra la pérdida de dos moléculas de propano-1,2,3-ácido tricarboxílico (ácido tricarbalílico) lo que ocasiona la hidrólisis de FB_1 a aminopentol (Sydenham *et al.*, 1995). El tratamiento con hidróxido de calcio en maíz molido y entero conteniendo FB_1 a temperatura ambiente durante 24 horas ocasionó la pérdida considerable de FB_1 y la aparición de AP_1 en la fracción acuosa del calcio, además de detectarse FB_1 parcialmente hidrolizada, una mezcla de monoésteres (Shephard *et al.*, 1994; Sydenham *et al.*, 1995).

El AP_1 y el correspondiente producto hidrolizado de FB_2 (AP_2) fueron más tóxicos que los correspondientes FB_1 y FB_2 en algunos cultivos celulares (Abbas *et al.*, 1993; Gelderblom *et al.*, 1993). Sin embargo, el AP_1 no fue iniciador de cáncer en el hígado de ratas, aunque la FB_1, FB_2 y la FB_3 lo fueron (Gelderblom *et al.*, 1993); la escasa absorción de los compuestos pudo ser la posible explicación.

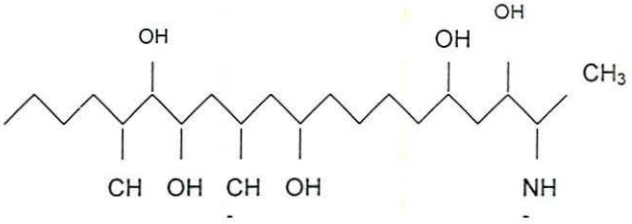


Figura 7. Estructura química del hidrolizado de FB_1 (AP_1)

El estudio sobre el efecto de los procesos es complicado por la escasez de métodos analíticos propicios. Las fumonisinas tienen el inconveniente que no siempre son extractadas y recuperadas de diferentes matrices, la mayoría de los métodos trabajan mejor en la recuperación a partir de maíz. Por lo que una vez que el maíz ha sido calentado o procesado, la extracción normal no recupera o mide el total de las fumonisinas. El calentamiento del maíz y de muestras de alimentos presentaron decremento en la eficiencia de extracción por los métodos actuales (Bordson *et al.*, 1993).

8. REDUCCIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS CON LA CONTAMINACIÓN DE FUMONISINAS EN MAÍZ

8.1. Introducción.

El interés de las comunidades científicas y regulatorias por las fumonisinas ha crecido en respuesta de la incidencia de enfermedades de origen no microbiano en granjas y por el potencial riesgo a la salud pública. Medidas preventivas y de control se han diseñado con el propósito de evitar la contaminación por la principal especie productora de fumonisinas, *Fusarium verticillioides*, patógeno que causa infección local y sistémica a la planta de maíz. Entre las medidas preventivas se encuentran las prácticas agrícolas que eviten el estrés en el cultivo de maíz. Una vez presentes los niveles de fumonisinas en el maíz se recomienda diversos tratamientos que permitan la descontaminación y reduzcan el riesgo de exposición en animales, tales como la amoniación y nixtamalización. Como parte de las estrategias para el control de fumonisinas, la FDA junto con el Instituto de Seguridad de Alimentos y Aplicaciones en Nutrición (OMS) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos proporcionaron una guía que presenta los niveles recomendables de dichas micotoxinas para la alimentación de humanos y animales.

8.2. Control y Prevención de *Fusarium verticillioides*.

El control de *F. verticillioides* depende de la prevención de la infección y del desarrollo del patógeno en el campo y almacén. Es importante determinar los factores involucrados en la patogenicidad del hongo y en la resistencia del hospedante (Desjardins *et al.*, 1992) con el objeto de establecer las prácticas más apropiadas de control biológico, químico y genético de la enfermedad.

El biocontrol ofrece tres aspectos: el uso de un agente que destruya al hongo, como un predador o un parásito, el uso de un agente que compita por el nicho

ecológico, o un agente que secrete una "sustancia" que destruya al hongo toxígeno y/o sus metabolitos. Se han utilizado levaduras, mohos, bacterias, actinomicetos, algas y esporas. El comportamiento de las contaminaciones por *F. verticillioides* es variable debido a que existe heterocigocidad dentro de los cultivos de maíz además de una variación genética dentro de la especie del hongo y diferencia en las condiciones ambientales. La habilidad de las especies de *Fusarium* para colonizar al maíz y producir micotoxinas sugiere que estas especies son altamente competitivas (Bacon & Nelson, 1994).

El biocontrol con especies de bacterias como productoras de sustancias con actividad fungicida sobre especies de *Fusarium* incluyen los géneros *Pseudomonas* y bacilos. Recientes investigaciones realizadas en Argentina mostraron que la cepa de *Bacillus subtilis* inhibe el crecimiento de *Fusarium verticillioides* en el medio de cultivo. Respecto a la producción de fumonisina B_1, se redujo 80% y 60% en los niveles de toxina a los 21 y 28 días de inoculación respectivamente (Cavaglieri *et al.*, 1997).

El manejo del cultivo antes y después de la cosecha influye en gran medida en los niveles de contaminación por hongos, sin embargo la carencia de datos en México sobre factores climáticos y de manejo agrícola limita el progreso en esta área (Rodríguez, 1994).

El balance adecuado en la fertilización se realiza con el fin de evitar el estrés de las plantas. La sequía ha sido asociada con el bajo aprovechamiento de nitrógeno por la planta, lo que incrementa el estrés fisiológico y en consecuencia la susceptibilidad a los hongos productores de micotoxinas. La competencia interespecífica en altas densidades de población, por humedad, nutrientes y luz, así como competencia del cultivo con la maleza pueden ser factores predisponentes (Jugenheimer, 1981).

En relación con la cosecha, se recomienda utilizar maquinaria que evite el quebrado del grano y la presencia de residuos del cultivo que contribuyan a la infección con hongos y a la producción de toxinas. Se recomienda secar rápidamente el grano para evitar problemas en el almacén. Es importante la entrega rápida de grano cosechado ya que la contaminación durante el transporte se incrementa hasta un 6% cada día. En los productos almacenados se recomienda bajar el contenido de humedad a niveles inferiores a los requeridos por el hongo (22% para *F. verticllioides*). Existen evidencias que señalan que altas concentraciones de bióxido de carbono o bajas concentraciones de oxígeno inhiben la síntesis de algunas micotoxinas (Bullerman & Northolt, 1982).

El uso de fungicidas se ha inclinado prácticamente al tratamiento con ácido propiónico y mezclas de otros ácidos orgánicos o sus sales, sin embargo estas sustancias le imparten un sabor y olor desagradable al grano por lo que no se usa para alimentación humana. El uso del fungicida tiabendazole, es una alternativa promisoria ya que no es tóxica para el hombre y animales (Moreno, 1988).

Las soluciones para minimizar las pérdidas ocasionadas por la contaminación de hongos deben incluir un manejo total y multidisciplinario desde la selección de la semilla hasta el consumo del maíz. Los fitomejoradores deben mejorar la generación de nuevos híbridos y variedades mediante la inclusión de genes más resistentes a las condiciones adversas que predisponen a las plantas al ataque de hongos toxígenos.

Se ha determinado que ciertas características de la variedad como la cobertura de la mazorca, grosor del pericarpio y la tolerancia a plagas son importantes en la reducción del riesgo de contaminación (Bullerman & Northolt, 1982; Riley *et al*, 1993b).

8.3. Reducción de la Contaminación por Fumonisinas

Tratamientos de amoniación han reportado una reducción parcial de fumonisinas, sin embargo, la toxicidad del material tratado fue retenida (Norred *et al.*, 1991). Park *et al.* (1992) observaron una reducción del 80% de FB_1 después de la amoniación.

El proceso de nixtamalización, utilizado para la elaboración de la tortilla, hidroliza las fumonisinas en cadenas de aminopentoles, los cuales parecen conservar la toxicidad (Sydenham, et al., 1994).

Se han realizado estudios sobre el efecto de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), estos involucran nixtamalización modificada, combinando el uso de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$) con H_2O_2 y $NaHCO_3$ (Carbonato de sodio), los resultados indican destrucción de la fumonisina.

Los procesos de fermentación utilizados para la producción de etanol a partir de maíz, reportan que las fumonisinas se concentraron en el grano destilado después del proceso de fermentación normal. No hubo reducción significativa en la producción del alcohol (Bothast *et al.*, 1992). La fermentación modificada (fermentación con compuestos de amoniaco) pueden afectar la estructura de fumonisinas. Los enlaces éster de la molécula de fumonisinas son alterados en presencia de etanol, amoniaco y calor.

Se requieren investigaciones que evaluen la efectividad y seguridad de los tratamientos de descontaminación, así como de pruebas de toxicidad de los productos generados.

8.4. Estimación del riesgo de exposición a fumonisinas.

Los estudios de evaluación de riesgos son utilizados para estimar la probabilidad que existe sobre el daño a la salud de consumidores, que puede ocurrir por la exposición a diversas sustancias peligrosas como las fumonisinas. Estos estudios comprenden un proceso de cuatro etapas: identificación del compuesto químico, valoración de la exposición, caracterización del compuesto (que incluye dosis/respuesta) y caracterización del riesgo. Además genera información cuantitativa de factores que influyen para que se presente una situación no deseable y permita un adecuado manejo.

Identificación del agente de riesgo (fumonisinas)

Estudios epidemiológicos han identificado a las fumonisinas como sustancias contaminantes que pueden estar presentes en los alimentos y causar enfermedad a los consumidores. Las investigaciones incluyen la estimación de las concentraciones presentes en los alimentos, su presentación y las fuentes de exposición.

Valoración de la exposición

La valoración permite estimar la cantidad de fumonisinas que es ingerida por la población, además de estimar otras características, como subpoblaciones expuestas a diferentes niveles de riesgo o consumos variables de dicha micotoxina presente en el alimento. Esto depende de la etapa de producción (cultivo o almacenamiento del maíz) o por los procesos a los que se somete el alimento.

Las fumonisinas se presentan comúnmente en cereales como el maíz y permanecen en diversos productos derivados, tales como harina de maíz, tortillas y hojuelas de maíz entre otros, sin embargo, actualmente los reportes sobre el

grado de contaminación es impreciso por proceder de escaso número de muestras. Algunos países como Alemania, Inglaterra, Suiza y Sudáfrica han estimado con base en la ingestión de maíz el consumo diario de fumonisinas en una persona de 70 kg de peso promedio. Thiel *et al.* (1992) reportan un consumo diario de maíz en Transkei, Sudáfrica de 460 g, en Alemania e Inglaterra de 7 g en y de 4 g por persona en Suiza.

Asumiendo el promedio de peso de un adulto de 70 kg y un promedio de contaminación por fumonisinas de 1.7 μg/g en maíz sano en áreas de alta incidencia de cáncer esofágico en Transkei, Sudáfrica y de 0.5 μg/g en los países de Europa, fue posible calcular un consumo diario de 11.2 μg/kg de peso vivo/día en Transkei, de 0.05 μg/kg, en Alemania e Inglaterra y de 0.03 μg/kg de peso vivo/día en Suiza (Shephard *et al.*, 1996).

En un estudio, Gelderblom *et al.* (1996) estimaron el nivel de efectos no observados (NOEL) en ratas por el consumo de fumonisinas, determinando un consumo diario tolerable (TDI/NOEL/1000) de fumonisinas de 0.8 μg/kg de peso vivo/día, por lo que en las comunidades del norte de Europa, las fumonisinas no representan un riesgo a la salud. Sin embargo, en Transkei, las comunidades rurales que dependen del consumo de maíz de cultivo casero, se encuentran con alto riesgo aun con maíz sano, sin considerar el consumo adicional de bebidas fermentadas procedentes de maiz altamente contaminado o de maíz mohoso que sustituya a maíz sano.

Los países de Latinoamerica, como México son altos consumidores de maíz y de productos derivados, sin que se tengan reportes sobre los niveles de consumo diario que permitan estimar el grado de exposición.

Caracterización de las fumonisinas (valoración dosis-respuesta)

La valoración de la dosis-respuesta incluye estimar la cantidad de la micotoxina, la frecuencia de su presentación y la magnitud de los efectos adversos producidos, además de estimar la severidad del daño.

La dosis mínima de fumonisinas que causa leucoencefalomalacia equina permanece sin ser determinada, sin embargo, se tienen reportes de 1.3 a 150 μg/g de FB_1 y de 0.1 a 23 de FB_2. En cerdos los niveles relacionados con el edema pulmonar son de 105 a 155 μg/g de FB_1(Colvin *et al.*, 1993; Haschek *et al.*, 1992).

Los niveles de fumonisinas presentes en las dietas de animales pueden ocasionar diversos efectos según la concentración y la vía de exposición. Niveles bajos en el alimento de equinos produce lesiones severas en cerebro y hepatotoxicidad leve, mientras que dosis altas ocasionan lesiones leves en cerebro y hepatoxicidad severa. En cerdos dosis mayores de 23 μg/g ocasionan hepatotoxicidad. En otras especies como aves y bovinos, los niveles de fumonisinas que causan alteraciones tienden a ser mayores. En pollos de engorda dosis superiores a 150 μg/g ocasionaron decremento del consumo de alimento y de la ganancia de peso, diarrea, elevada actividad enzimática en suero, necrosis hepática y requitismo (Weibking et al., 1993).

Caracterización del riesgo

Se refiere a la integración de la dosis/respuesta y la valoración de la exposición dentro de un estado de riesgo que describe la naturaleza y magnitud del riesgo asociados con la sustancia peligrosa.

El riesgo de exposición a sustancias químicas como micotoxinas, puede ser estimado mediante estudios que involucren biomarcadores presentes en fluidos y tejidos biológicos. Las fumonisinas pueden ser detectadas en orina de animales

pero la sensiblidad de la metodología actual sólo permite su monitoreo cuando el consumo de estas micotoxinas es elevado. Los estudios de toxicidad en modelos de animales en la exposición a fumonisinas, han desarrollado como biomarcadores a los grupos esfingoides (esfingonina/esfingosina), los cuales alteran su relación por efecto del mecanismo de acción de las fumonisinas (Riley *et al.*, 1994).

La relación afectada se ha observado en tejidos (hígado, riñón y pulmón), suero y orina en un gran número de animales. La medición de los biomarcadores junto con la determinación precisa del consumo de fumonisinas en el maíz y sus derivados, permite evaluar apropiadamente el riesgo de exposición y correlacionar sus efectos tóxicos y carcinogénicos en humanos y animales (De Nijs *et al.*, 1998).

Las investigaciones indican que la ceramida sintasa, enzima que se involucra en la biosíntesis de esfingolípidos es el blanco celular de la toxicidad de fumonsinas, ocasionando reducción de dicha biosíntesis, incremento de la esfingonina y esfingosina (SA/SO) y alteración de su relación a nivel celular y extracelular. Wang *et al*, (1992) observaron incremento de esfingonina de 2.7 veces (día 2) hasta 13 veces (día 10) por el consumo de dietas conteniendo 44 ppm de FB_1, mientras que la esfingosina se incrementó dos veces al día 10. Solfrizo *et al.* (2000) reportan valores de la relación SA/SO en orina de humanos, considerando como valores promedio de la relación a 0.34 ± 0.17, obtenida del análisis de 41 muestras de orina humana colectada en el sur de Italia (población que no consume maíz). El análisis de la relación SA/SO en muestras de orina de personas con alto consumo de maíz en Argentina, mostró valores en un rango de 1.2 a 4.5, encontrándose niveles de fumonisinas en muestras de maíz en un rango de 0.14 a 2.14 μg/g.

8.5. Estrategias para el control de fumonisinas.

La FDA junto con el Instituto de Seguridad de Alimentos y Aplicaciones en Nutrición (Organismo Mundial de la Salud) y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos proporcionaron una guía de niveles que recomiendan los límites máximos de fumonisinas para alimentos de humanos y animales*, los cuales se obtienen cuando se utilizan buenas prácticas agrícolas y de manufactura. La FDA considera que bajo estos niveles recomendados se puede reducir la exposición a efectos adversos de salud en animales y humanos asociados con fumonisinas.

Tabla 7. Guía de niveles recomendables de fumonisinas para humanos y Animales (publicada el 6 de Noviembre del 2001 *).

Alimentos de Humanos	
Producto	Total Fumonisinas (FB_1+FB_2+FB_3)
Productos de maíz molido desgerminado (ejem., hojuelas, maíz parcialmente molido, harina de maíz con < 2.25%de grasa, base seca)	2 partes por millón (ppm)
Productos de maíz molido total o parcialmente desgerminado (ejem., hojuelas, maíz parcialmente molido, harina de maíz con ≥ 2.25%de grasa, base seca)	4 ppm
Salvado de maíz	4 ppm
Maíz para la producción de masa	4 ppm
Maíz para palomitas	3 ppm

* FDA/CFSA; Draft Guidance for Industry: Fumonisin Levels en Human Foods and Animal Feed. http://vm.cfsan.fda.gov//.Edms/fumongui.html

Alimentos para animales	
Maíz y subproductos de maíz para:	Total Fumonisinas (FB_1+FB_2+FB_3)
Equinos y conejos	5 ppm (no más del 20% de la dieta)**
Cerdos y pez gato	20 ppm (no más del 50% de la dieta)**
Rumiantes, pollos y visón en crianza*	30 ppm (no más del 50% de la dieta)**
Rumiantes $\geq$ 3 months a finalización y visones hasta la producción de piel.	60 ppm (no más del 50% de la dieta)**
Pollos finalización	100 ppm (no más del 50% de la dieta)**
Otras especias productivas o mascotas	10 ppm (no más del 50% de la dieta)**

*Incluye vacas en lactación y gallinas ponedoras de huevo para consumo humano.
**Base seca.

III. CONCLUSIONES

1. Las fumonisinas se aislaron y caracterizaron en 1988 por Gelderblom *et al.* a partir de la cepa MRC de *Fusarium verticillioides*. Bezuidenhout *et al.* en el mismo año elucidaron las estructuras químicas de FB_1 y FB_2.
2. En 1990 se presentan los brotes de leucoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino, considerándose la FB_1 la responsable.
3. *Fusarium verticillioides* es el principal hongo productor de fumonisinas en el maíz, con presentación endófita y asintomática en la planta.
4. Las fumonisinas se caracterizaron como diesteres de ácido tricarboxílico y amino-alcoholes de 22 carbonos, encontrándose 13 tipos, entre los que sobresalen la FB_1, FB_2 y FB_3 por su potente actividad promotora de cáncer.
5. El mecanismo de acción de fumonisinas involucra la alteración del metabolismo de esfingolipidos que afecta la integridad de las membranas celulares y mecanismos de regulación celular.
6. Los principales efectos biológicos de las fumonisinas son la leuncoencefalomalacia equina y el edema pulmonar porcino.
7. La metodología analítica para la detección de fumonisinas se fundamenta en técnicas de cromatografía de liquidos de alta precision y de gases acoplada a espectrometria de masas, ademas de las desarrolladas con anticuerpos mono y policlonales.
8. Los niveles recomendados por la Asociación Americana de Diagnostico Veterinario del Comité de Micotoxinas es para equinos de 5 ppm, cerdos de 10 ppm y aves y bovinos de 50 ppm.
9. La prevención y control de la contaminación por fumonisinas involucran medidas en precosecha y postcosecha, recomendándose evitar la contaminación por el hongo *F. verticillioides* y reducir el consumo de los niveles de riesgo.
10. Es necesario realizar estudios epidemiológicos y de estimación de riesgos de exposición en animales y en humanos que consuman alimentos contaminados por fumonisinas.

IV. BIBLIOGRAFÍA

<Abbas, H.K., Gelderblom, W.C.A., Cawood, M.E, and Shier, W.T. 1993. Biological activities of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*, in jimsonweed (*Datura stramonium L.*) and mammalian cell cultures. Toxicon., 31:345-353.

<Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. Schalkwyk, D.J. and Behrend, Y. 1990. Effects of temperature and incubation period on production of Fumonisin B1 by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol., 56:1729-1733.

<Azcona, O.J., Abouzied, M. M., Plattner, D.R. and Pestka J.J, 1992. Production of monoclonal antibodies to the mycotoxins Fumonisins B_1,FB_2 and B_3 J. Agric. Food Chem., 40 :531-534.

<Bacon, CH. W. and Nelson, P.E. 1994. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. J. Food Prot., 6 :514-521.

<Bennett G.A. and Richard, J. L. 1995. Distribution of fumonisins in food and feed products prepared fron contaminated corn. In: Jackson L.S., Devries, J.W. and Bullerman Ll.B. 1996. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306.

<Bezuidenhout, S.C. and Gelderblom, W.C.A. 1988. Structure elucidation of fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J. Chem. Soc. Commun., 4 :743-745.

<Bjeldanes, L.F. and Thomson, S.V. 1979. Mutagenic activity of *Fusarium moniliforme* isolates in the *Salmonella typhimurium* assay. Appl. Environ. Microbiol., 27:1118-1121.

<Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237. *In*: Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G. and Gelderblom, W.C.A. 1990. Quantitative determination of fumonisins B_1 and B_2 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Liq. Chrom., 13(10):2077-2087.

<Bordson, G., Meerdink, G., Bauer, K. and Tumbleson, M. 1993. Effects of drying temperature on fumonisin recovery from feeds. J. AOAC Int., 78: 1183-1188.

<Bothast, R.J., Bennett, G.A. and Richard, S.L. 1992. Fate of fumonisin B1 in natural contaminated corn during ethanol production. Appl. Environ. Microbiol., 58: 233-236.

<**Bullerman, LL.B**. and Draughon, F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Symposium. J. Food Prot., 57 (6): 513.

<**Bullerman, LL.B**. and Tsai Wei-Yun, J. 1994. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. J. Food Prot., 57 (6): 541- 546.

<**Burgess, L.W**. and Liddell, C.M. 1983. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. Fusarium Research Laboratory. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. The University of Sydney. 162.

<**Casteel, S.W., Turk, J.R., Rottinghaus, G.E.** 1994. Chronic effects of dietary fumonisin on the heart and pulmonary vasculature of swine. Fundam. Appl. Toxicol. In: Jackson L.S., Devries, J.W. and Bullerman Ll.B. 1996. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306.

<**Castelo, M.M**, Sumner, S.S. and Bullerman, M.B. 1998. Occurrence of fumonisins in corn – based Food Products, J. Food Prot., 61 (6): 704-707.

<**Cohen, S.M.** and Ellwein, L.B. 1990. Cell proliferation in carcinogenesis. Science, 249:1007-1011.

<**Cole, R.J.,** Kirksey, J. W., Cutler, H.G., Doupnik, B.L. and Peckham, J.C. 1973. Toxin from *Fusarium moniliforme*: effects on plants and animals. Science, 179:1324-1326.

<**Colvin, B.M.**, Cooley, A.J. and Beaver, R.W. 1993. Fumonisin toxicosis in swine : Clinical and pathologic findings. J. Vet. Diagn. Invest., 5 :232-241. *In*: Norred, W.P. and Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J. Food Prot., 57(6) :522-527.

<**Colvin, B.M.** and Harrison, L.R. 1992. Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine. Mycopathologia, 117:79-82.

<**Cooke, W.B.** 1962. Species of Fusarium isolated from a waste stabilization pond system. Mycopath. Mycol. Appl. 18:225-233.

<**Chang, Y.S.,** Zhang, C.L., Zhao, P.Z. and Deng, Z.L.1991. Human aortic proteoglicans of subjects from districts of high and low prevalence of atherosclerosis in China. Atherosclerosis, 31:9-15.

<**Chu, Q.,** Cook, M.B., Wu, W. and Smalley, E.B. 1988. Immune and bone properties of chick consuming corn contaminated with a *Fusarium* that induces dyschondroplasia. Avian Dis., 32:132-136.

<**Chulze, S.N.,** Ramírez, M.L., Farnochi, M.C., Pascale, M., Visconti, A. and March, G. 1996. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. J. Agric. Food Chem., 44:2797-2801.

<**Davis, R.M.,** Kegel, F.R., Sills,W.M. and Farrar, J.J. 1989. *Fusarium* ear rot of corn. Calif. Agric., 43: 4-5.

<**Desjardins, A.E.**, Plattner, R.D. and Nelson, P.E. 1994. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in Northeast Mexico. Appl. Environ. Microbiol., 60(5) :1695-1697.

<**Doko, M.B**, Rapior, S., Visconti, A. and Schjoth, J.E. 1995. Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. J. Agric. Food Chem., 43: 429-434.

<**Doko, M.B.** and Visconti, A. 1993. Fumonisin contamination of corn and corn based foods in Italy. United Kingdom Workshop on Occurrence and significance of mycotoxins. April 21-23. London. *In:* Bullerman, LL.B. and Draughon F.A. 1994. *Fusarium moniliforme* and Fumonisin Symposium. J.Food Prot., 57 (6): 513.

<**Dombrink-Kurtzman, M.A.** and Dvorak, T.J. 1999. Fumonisin content in masa and tortillas from Mexico. J. Agric. Food Chem., 47:622-627.

<**Dupuy, J.,** Le Bars, P., Boudra, H. and Le Bars J. 1993. Thermostability of fumonisin B1 a mycotoxin from *Fusarium moniliforme* in corn. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2864-2867.

<**Eiker, A.** 1976. Non-parasitic mycoflora of the phylloplane and litter of *Panicum coloratum.* Trans. Br. Mycol. Soc, 67:275-281.

<**Engelhardt, J.A.,** Carlton, W.W. and Tuite, J.F. 1989. Toxicity of *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* for chicks, duckling and turkey poults. Avian Dis., 33: 357-360.

<**Flood, J.,** Mepsted, R. and Copper R.M. 1990. Contamination of oil palm pollen and seeds by *Fusarium* spp. Mycol. Res., 94:708-709.

Food and Drug Administration. 2000. Fumonisin levels in human foods and animal feeds. Guidance for Industry. U.S. Department of Health and Human Services. http//vm.cfsan.fda.gov//.Edms/fumongui.html

<**García, T.M.** 1995. Confirmación química y estudio epizootiológico de fumonisina B_1 en maíz de Oaxaca causante de Leucoencefalomalacia Equina. Tesis de Licenciatura de Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. 18-24.

<**Gelderblom, W.C.A.**, Cawood, M, E., Snyman, S.D. Vleggaar, R. and Marasas, W.F.O. 1993. Structure-activity relationships of fumonisins in short-term carcinogenesis and citotoxicity assays. Food Chem. Toxicol. *In:* Norred, W.P. and Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J. Food Prot., 57(6) :522-527.

<**Gelderblom, W.C.A.**, Jaskrewiez, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vleggaar, R. and Kriek, N.P.J. 1988. Fumonisins- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. Appl. Environ. Microbiol., 54 :1806-1811.

<**Gelderblom, W.C.A.**, Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. and Thiel, P.G. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B1 in rats. Carcinogenesis, 12:1247-1251.

<**Gelderblom, W.C.A.**, Thiel, P.G., Jaskrewiez, K. and Marasas, W.F.O. 1986. Investigations on the carcinogenicity of fusarin C-a mutagénic metabolite of *F. moniliforme*. Carcinogenesis, 7:1899-1901.

<**Hanada, K. M.,** Kiso, H., Hasegawa, A., Fujita, S., Ogawa, T. and Akamatsu, Y. 1992. Sphingolipids are essential for the growth of Chinese hamster ovary cells. Restoration of the growth of a mutant defective in sphingoid base biosyntesis with exogenous sphingolipids. J. Biol. Chem., 267: 23527-23533.

<**Harel , R.,** Futerman, A, H. 1993. Inhibition of sphingolipids sythesis affect axonal outgrowth in cultured hippocampal neurons. J. Biol. Chem. 268 : 14476-14482. In: Jackson L.S., Devries, J.W. and Bullerman Ll.B. 1996. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306.

<**Harris, C.C.** 1991. Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Res., 51:5023-5044.

<**Harrison, L.R.,** Colvin, B.M., Greene, J.T., Newman, L.E. and Cole, R.J. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B_1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. J. Vet. Diagn. Invest., 2:217-221.

<**Haschek, W.M.,** Kim, H.-Y, Motelin, G.K., Stair, E.L. and Beasley, W.J. 1992. Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. Mycopathologia, 117:83-96.

<**Haschek, W.M.,** Kim, H.-Y, Motelin, G.K., Stair, E.L. Beasley, W.J., Chamberlain, W.J. and Riley, R.T. 1993. Pure fumonisin B1, as well as fumonisin-contaminated feed, alters swine serum and tissue sphinganine and sphingosine levels, biomarkers of exposure. Toxicologist, 13:232-236.

<**Hendrich, A.**, Miller, K.M., Wilson, T.M. and Murphy, P.A. 1993. Toxicity of *Fusarium proliferatum* fermented nixtamalized corn based diets fed to rats: Effect of nutritional status. J. Agric. Food Chem., 41:1649-1654.

<**Herrera, T.** y Ulloa, M. 1990. El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. UNAM y Fondo de Cultura Económica, México. 552.

<**Holliday, P.** 1989. Fungus diseases of tropical crops. Cambridge University Press. Great Britain. 203-215.

<**Hopmans, E. C.** and Murphy, P.A. 1993. Detection of fumonisins B_1, B_2, B_3 and hydrolyzed fumonisin B_1 in corn containing foods. J. Agric. Food Chem., 41:1655-1658.

<**Jackson, M.A.** and Bennett, G.A. 1990. Production of fumonisin B_1 by *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 in submerged culture. Appl. Environ. Microbiol, 56:2296-2298.

<**Jackson, L.S.**, Hlywka, J.J., Senthil, K.R. and Bullerman Ll. B. 1996. Effects of thermal processing on the stability of fumonisins. Adv. Exp. Med. Biol. 392:345-353.

<**Katta, S.K.** 1994. Effect of handling and storage on popcorn quality related to mold content and expansion volume. M.S. Thesis. University of Nebraska, Lincoln, N.E. *In*: Bullerman, LL.B. and Tsai Wei-Yun J. 1994. Incidence and levels of *Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum* and fumonisins in corn and corn-based foods and feeds. J. Food Prot., 57 (6): 541- 546.

<**Kellerman, T.S.**, Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Gelderblom, W.C.A. and Cawood, M.A. 1990. Leucoencephalomalacia in two horses induced by oral dosing of fumonisin B_1. Onderstepoort J. Vet. Res., 57:269-275.

<**Kmet, J.** and Mahboubi, E. 1972. Esophageal cancer in the Caspian Litoral of Iran. Initial studies. Science, 175:846-853.

<**Kriek, N. P. J.**, Kellerman, T.S. and Marasas, W.F.O. 1981. A comparative study of the toxicity of *Fusarium moniliforme* to horses, primates, pigs, sheep and rats. Onderstepoort J. Vet. Res., 48:129-131.

<**Leslie, J.F.**, Plattner, R.D., Desjardins, A.E. and Klittich, C.R.J. 1992. Fumonisin B_1 production by strains from different mating populations of *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). Phytopathology, 82:341-345.

<**Li, M.**, *Lu, S., Wang, M. and Tian, G.* 1980 Experimental studies on the carcinogenicity of fungus contaminated food from Lixian County. *In*: Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W. F.O. and Stockenstrom, S. 1991.

Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. J. Agric. Food Chem., 39 :2014-2018.

<**Marasas, W.F.O.,** Kellerman, T.S., Gelderblom, W.C.A., Coetzer, J.A.W. and Thiel, P.G. 1988. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1, isolated from *Fusarium moniliforme*. Onderstepoort J. Vet. Res., 55:197-203.

<**Marasas, W.F.O.,** Kriek, N.P.J., Wiggins, V.M., Steyn, P.S., Towers, D.K. and Hastie, T.J. 1979. Incidence, geographic distribution and toxigenicity of *Fusarium* species in South African corn. Phytopathology, 69:1181-1185.

<**Marasas, W.F.O.,** Thiel, P.G., Rabie, C.J., Nelson, P.E. and Toussoun, T.A. 1986. Moniliformin production in *Fusarium* section Liseola. Mycologia, 78:242-247.

<**Marasas, W.F.O.,** Wehner, F.C. and Van Schalkwyk, D.J. 1981. Mycoflora of corn produced in human esophageal cancer areas in Transkei, South Africa. Phytopathology, 71: 792-796.

<**Marijanovic, D.R**., Holt, P.,Norred, W.P., Bacon, C.W., Voss, K.A., Stancel, P.C. and Ragland, P. 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chickens. Poultry Sci., 70: 1895-1901.

=**Meredith, F.I.,** Torres, O.R., Saenz de Tejada, S. Riley, R.T. and Merrill A.H. Jr. 1999. Fumonisin B_1 and hydrolysed fumonisin B_1 (AP_1) in tortillas and nixtamalized corn (*Zea mayzs L.*) from two different geographic locations in Guatemala. J.Food Prot. 62(10): 1218-1222.

<**Merrill, A.H., Jr.** 1991. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. J. Bioenerg. Biomemb., 23:83-104.

<**Merril, A.H., Jr.,** Wang, E. Gilchrist, D.G., Riley, R.T. 1993. Fumonisins and other inhibitors of the novo sphingolipids biosynthesis. In: Jackson L.S., Devries, J.W. and Bullerman Ll.B. 1996. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306.

<**Merril, A.H., Jr.,** Wang, E., Vales, T.R. 1996. Fumonisin toxicity and sphingolipid biosythesis. Advances in Experimental Medicine and Biology 392:297-306.

<**Merrill, A.H.,** Echten, G., Wang, E. and Sandhoff, K. 1993. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphingonine) N-acyltransferase and de *novo* sphingolipid biosynthesis in cultured neurons *in situ*. J.Biol. Chem., 268:27299-27306.

<**Miller, J.D.** 1993. Production of fumonisins in liquid culture. 106th Annu. Assoc. Off. Anal. Chem. Meet., Cincinnati, Ohio, USA. 106.

<Murphy, P.A., Rice, L.G. and Ross, F. 1993. Fumonisin B_1, B_2 and B_3 content of Iowa, Wisconsin and Illinois corn and corn screenings. J. Agric. Food Chem., 41 :263-266.

<Musser, S.T. and Plattner, R.D. 1997. Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme, Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. J. Agric. Food Chem., 45:1169-1173.

<Nelson, P.E. 1992a. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. Mycopathologia, 117:29-36.

<Nelson, P.E., Desjardins, A.E. and Plattner, R.D. 1993. Fumonisins mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry and significance. Annu. Rev. Phytopathol., 31: 233-252.

<Nelson, P.E., Dignani, M.C. and Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology and clinical aspects of *Fusarium* Species. Clin. Microbiol. Rev., 7(4) :479-504.

<Nelson, P.E., Juba, J.H., Ross, P.F. and Rice, L.G. 1992 b. Fumonisin production by *Fusarium* species on solid substrates . J. AOAC International, 77:522-525.

<Nelson, P.E., Plattner, R.D., Schackelford, D.D. and Desjardins, A.E. 1991. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. Appl. Environ. Microbiol., 57: 2410-2412.

<Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. and Desjardins, A.E. 1992c. Fumonisin B_1 production by *Fusarium* species other than *Fusarium moniliforme* in section Liseola and by some related species. Appl. Environ. Microbiol., 58(3) :984-989.

<Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium species*. An illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University, USA. 128-131.

<Norred, W.P., Voss, K.A., Bacon, C.W. and Riley, R.T. 1991. Effectiveness of ammonia treatment in detoxification of fumonisin-contaminated corn. Food Chem. Toxicol. 29:815-819.

<Norred, W.P., Plattner, R.D., Vesonder, R.F., Bacon, C.W. and Voss, K.A. 1992. Effects of selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. Food Chem. Toxicol., 30:233-237.

<Norred, W.P. and Voss, K.A. 1994. Toxicity and role of fumonisins in animal diseases and human esophageal cancer. J. Food Prot., 57(6): 522-527.

<**Osweiller, G.D.,** Ross, P.F., Wilson, T.M., Nelson, P.E. and Witte, S.T. 1992. Characterization of an epizootic of pulmonary edema in swine associated with fumonisin in corn screenings. J. Vet. Diagn. Invest., 4:53-59.

<**Park, D.L.,** Lopez, G.R., Trujillo, P.S. and Price, R.L. 1996. Reduction of risks associated with fumonisin contamination in corn. Adv. Exp. Med. Biol. 392: 335-344.

<**Pittet, A.**, Parisod, V. and Schellenberg, M. 1992. Occurrence of Fumonisins B_1 and B_2 in corn based products from the swiss market. J. Agric. Food Chem., 40 :1352-1354.

<**Rheeder, J.P.,** Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Vanschalkwyk, T. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. Phytopathology, 82:353-357.

<**Riley, R.T.,** An, N.Y., Showker, J.L., Yoo, H.S., Norred, W.P., Chamberlain, W.J., Wang, E. and Merrill, A.H. 1993a. Alteration of tissue and serum sphinganine to sphingosine ratio: An early biomarker in pigs of exposure to fumonisin-containing feeds. Toxicol. Appl. Pharmacol., 118:105-112.

<**Riley, R.T.**, Hinton, D.M., Chamberlain, W.J., Bacon, C.W., Wang, E., Merrill, A.H. and Voss, K.A. 1994a. Dietary Fumonisin B_1 induces disruption of sphingolipid metabolism in Sprague Dawley rats : A new mechanism of nephrotoxicity. J. Nutr., 124 :594-603.

<**Riley, R.T.**, Voss, K.A., Soo Yool, H., Gelderblom, W.C.A. and Merrill, A.H. 1994b. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. J.Food Prot., 57(6) :528-535.

<**Riley, R.T.,** Norred, W.P. and Bacon, Ch.W. 1993b. Fungal toxins in foods. Recent Concerns. Annu. Rev. Nutr., 13:167-189.

<**Ross, P.F.,** Nelson, P.E., Owens, D.L., Rice L.G., Nelson, H.A. and Wilson T.M. 1994. Fumonisin B_2 in cultured *Fusarium proliferatum* M-6104, causes equine leukoencephalomalacia. J. Vet. Diagn. Invest. (In press). *In*: Riley, R.T., Voss, K.A., Soo Yool, H., Gelderblom, W.C.A. and Merrill, A.H. 1994b. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. J.Food Prot., 57(6) :528-535.

<**Ross, P.F.**, Nelson, P.E., Richard, J.L., Osweiler, G.D., Rice, L.G., Plattner, R.D. and Wilson, T.M. 1990. Production of Fumonisins by *Fusarium moniliforme* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. Appl. Environ. Microbiol., 56 :3225-3226.

<**Ross, P.F.,** Rice, L.G., Plattner, R.D., Osweiler, G.D. and Wilson, T.M. 1991. Concentrations od fumonisin B_1 in feeds associated with animal health problems. Mycopathologia, 114:129-135.

<**Rothinghaus, E.G.**, Coathey, E.C. and Minor, C.H. 1992. A rapid sensitive thin layer chromatography procedure for detection of fumonisin B_1 and B_2. J. Vet. Diagn. Invest., 40 :326-329.

<**Sala, N.**, Sanchis, V., Vilaro, P., Viladrich, R., Torres, M., Viñas, I. and Canela, R. 1994. Fumonisin producing capacitiy of *Fusarium* strains isolated from cereals in Spain. J. Food Prot., 10 :915-917.

<**Sánchez, S.M.R.** 1987. Estudio anatomopatológico de tres casos de Leucoencefalomalacia en Equinos. Tesis de Licenciatura de la Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M. 16-25.

<**Schroeder, P.M.** , Crane, H.M., Xia, J., Liotta, D.C. and Merrill, A.M. 1994. Disruption of sphingolipid metabolism and stimulation of DNA synthesis by fumonisin B1. J. Biol. Chem., 269(5):3475-3481.

<**Scott, P.M.** 1993. Fumonisins. International J. Food Microbiol., 18: 257-270.

<**Scott, P.M.** and Lawrence, G.A. 1992. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. J. AOAC International, 75:829-834.

<**Segal, I.**, Reinach, S.G. and Beer, M. 1988. Factors associated with esophageal cancer in Soweto, South Africa. Br. J. Cancer, 56: 681-686.

<**Serna-Saldivar, S.O.**, Gómez, M.H. and Rooney, L.W. 1990. Technology, chemistry and nutritional value of alkaline cooked corn products. *In*: Advances in cereal Science and Technology; Pomeranz, Y., Ed. American Association of Cereal Chemists: St. Paul, MN., 10: 243-307.

<**Shephard, G.S.**, Sydenham, E.W., Thiel, P.G. and Gelderblom, W.C.A. 1990. Quantitative determination of fumonisins B_1, B_2 by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Liq. Chromatogr. 13(10):2077-2087.

<**Shephard, G.S.**, Thiel, P.G., Sydenham, E.W., Vleggaar, R. and Alberts, J.F. 1994. Determination of the mycotoxin fumonisin B_1 and identification of its partially hydrolyzed metabolites in the feces of non human primates. Food and Chemical Toxicology, 32:23-29.

<**Shephard, G.S.**, Thiel, P.G., Stockenstrôm, S. and Sydenham, E.W. 1996. Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn based products. J. AOAC Int., 79(3): 671-687.

<**Smith, E.R**. and Merril, A.H. Jr. 1993. Altering *de novo* sphingolipid biosynthesis affects phospholipid profiles in J774 macrophages. FASEB J. 7:A173 (Abstract). *In:*

Riley, R.T., Voss, K.A., Soo Yool, H., Gelderblom, W.C.A. and Merrill, A.H. 1994b. Mechanism of Fumonisin toxicity and carcinogenesis. J.Food Prot., 57(6) :528-535.

<**Stack, M.E.** 1998. Analysis of fumonisin B_1 and its hydrolisis product in tortillas. J. AOAC. Int., 81:737-740.

<**Stack, M.E.** and Eppley, R.M. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn products. J. AOAC. Int., 75: 834-837.

<**Sydenham, E.W.**, Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G. and Marasas, W.F.O. 1990a. Evidence for the natural occurrence of fumonisin B_1, a mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme* in corn. J. Agric. Food Chem., 38(1) :285-290.

<**Sydenham, E.W.**, Marasas, W.F.O., Shephard, G.S., Thiel, P.G. and Hirooka, E.Y. 1992a. Fumonisins concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. J. Agric. Food Chem., 40 :994-997.

<**Sydenham, E.W.**, Shephard, S.G. and Thiel, G.P. 1992b. Liquid chromatographic determination of fumonisins B_1, B_2 and B_3 in foods and feeds. J. AOAC International, 2: 313-318.

<**Sydenham, E.W.**, Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. and Stockenstrôm, S. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. J. Agric. Food Chem., 39 :2014-2018.

<**Sydenham, E.W.**, Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Rheeder, J.P., Peralta Sanhueza, C.E., González, H.H.L. and Resnik, S.L. 1993. Fumonisins in Argentinian field-trial corn. J. Agric. Food Chem., 41:891-895.

<**Sydenham, E.W.**, Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W. F.O. and Koch, K.R. 1990b. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei Southern Africa. J. Agric. Food Chem., 38:1900-1903.

<**Sydenham, E.W.,** Stockenstrom, S., Thiel, P.G., Shephard, G.S., Koch, K.R. and Marasas, W.F.O. 1995. Potential of alkaline hydrolysis for the removal of fumonisins from contaminated corn. J. Agric. Food Chem. 43:1198-1201.

<**Sydenham, E.W.,** Van der Westhuizen, L. Stuckenstrom, S., Shephard G.S., Thiel, P.G. 1994. Fumonisin-contaminated maise: Physical treatment for the partial decontamination of bulk shipments. Food Addit. Contam. 11: 25-32.

<**Tejeda, M.V.**, Marovatsanga, L.T. and Pestka, J.J. 1994. Comparative detection of fumonisin by HPLC, Elisa and Immunocyto-chemical localization in *Fusarium* cultures. J. Food Prot. 6 :666-672.

<**Thakur, R.A.** and Smith, J.S. 1996. Determination of fumonisins B1 and B2 and their major hydrolysis products in corn, feed and meat, using HPLC. J. Agric. Food Chem. 44:1047-1052.

<**Thiel, P.G.**, Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Gelderblom, W.C.A. and Nievwenhuis, J.J. 1991 a. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. Appl. Environ. Microbiol., 57(4) :1089-1093.

<**Thiel, P.G.**, Marasas, W.F.O. and Sydenham, E.W. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. Mycopathologia, 117 :3-9.

<**Thiel, P.G.**, Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Marasas, W.F.O., Nelson, P.E. and Wilson, T.M. 1991 b. Levels of fumonisins B_1 and B_2 in feeds associated with confirmed cases of equine leukoencephalomalacia. J. Agric. Food Chem., 39:109-111.

<**Thomas, M.D.** and Buddehagen, I.W. 1992. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. Mycologia, 77:882-887.

<**Ueno, Y.,** Sugiura, A.S., Wang, D-S, Lee, U.S., Hiroka, E.Y., Hara, S., Karki, T. Chen, G. and Yu, S-Z. 1993. A limited survey of fumonisins in corn and corn based products in Asia countries. Mycotoxin Research, 9:27-34.

<**Viquez, O.M.,** Castell-Perez, M.E. and Shelby, R.A. 1996. Occurrence of fumonisin B1 in maize grown in Costa Rica. J. Agric. Food Chem., 44:2789-2791.

<**Visconti, A.** and Doko, B. 1994. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. J. AOAC International, 77(2) :546-550.

<**Voss, K.A.,** Norred, W.P., Plattner, R.D. and Bacon, C.W. 1989. Hepatotoxicity and renal toxicity in rats of corn samples associated with field cases of equine leukoencephalomalacia. Food Chem. Toxicol., 27:89-96.
<**Voss, K.A.** Norred, W.P. and Bacon, C.W. 1992. Subchronic toxicological investigations of *Fusarium moniliforme*-contaminated corn, culture material and ammoniated culture material. Mycopathologia, 117 :97-104.

<**Wang, E.,** Norred, C.W., Bacon, R.T., Riley, R.T. and Merrill, A.H.Jr. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins: Implications for diseases associated by *Fusarium moniliforme*. J. Biol. Chem., 266:14486-14490.

<**Wang, E.,** Ross, P.F., Wilson, T.M., Riley, R.T. and Merrill, A.H. 1992. Increases in serum sphingosine and sphinganina and decreases in complex sphingolipids in ponies given feed containing fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium moniliforme*. J. Nutr., 122 :1706-1716.

<**Ware, G.M.,** Umrigar, P.P. and Carman, S.S. Jr., 1994. Evaluation of fumonitest immunoaffinity columns. Analytical Letters, 27(4): 693-715.

<**Weibking, T.S**., Ledoux, D.R., Bermudez, A.J., Turk, J.R. and Rottinghaw, G.E. 1993. Effects of feeding *Fusarium moniliforme* culture material, containing known levels of fumonisins B1 on the young broiler chick. Poultry Sci., 72 :456-466.

<**Weinstein, B.** 1991. Mitogenesis is only one factor in carcinogenesis. Science, 251:387-388.

<**Wilson, T.M**. and Marapont, R.R. 1971. Causative fungal agent of leucoencephalomalacia in equine animals. Vet. Rec., 88:484-486.

<**Wilson, T.M**., Ross, P.F., Owens, D.L., Rice, L.G. and Green, S.A. 1990. Fumonisin B_1 levels associated with an epizootic of equine leukoencephalomalacia. J. Vet. Diagn. Invest., 2:213-216.

<**Yang, C.S.** 1980. Research on esophageal cancer in China: A review. Cancer Res., 40:2633-2644.

<**Yoo, H-S.,** Norred, W.P., Wang, E., Merrill, A.H., Jr. and Riley, R.T. 1992. Fumonisin inhibition of the *novo* sphingolipid biosynthesis and citotoxicity are correlated in LLC-PK cells. Toxicol. Appl. Pharmacol, 114: 9-15.

<**Yoshizawa, T**., Yamashita, A. and Luo, Y. 1994. Fumonisin occurrence in corn form high and low risk areas for human esophageal cancer in China. Appl. Environ. Microbiol., 60(5) :1626-1629.