



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“EXPOSICIÓN DE CANINOS DOMÉSTICOS (*CANIS LUPUS
FAMILIARIS*) A OCRATOXINA A A TRAVÉS DE SU
ALIMENTACIÓN”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T A:

M.V.Z. ZAIRA VIANEY AGUADO ANDRADE



DIRECCIÓN DE TESIS:

D. EN C. VIRGINIA ANGÉLICA ROBINSON FUENTES

AGOSTO DE 2022, MORELIA MICHOACÁN, MÉXICO

La Maestría en Ciencias de la Salud de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de estos estudios de posgrado durante el periodo 2020-2022, en el laboratorio de Desarrollo Analítico a cargo de la D. en C. Virginia Angélica Robinson Fuentes.

No. de Becario: 764921

CVU: 042578

El jurado designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San

Nicolás de Hidalgo que conforman esta Tesis son:

D. en C. Gerardo Vázquez Marrufo

Presidente

D. en C. Virginia Robinson Fuentes

Vocal 1

D. en C. Ana Edith Higareda Mendoza

Vocal 2

D. en C. Marcia Yvette Gauthereau Torres

Vocal 3

D. en C. Ignacio Nezahualcoyotl Barajas López

Vocal 4

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo está dedicado con todo mi amor principalmente a mi mamá, a mi abuelito, a mis tíos, mis padrinos y primos por haber sido mi apoyo y mi motor de vida desde la infancia, por todos sus consejos y por impulsarme siempre a luchar por mis sueños durante toda mi formación profesional y a lo largo de la vida. También quiero dedicarla a la memoria de mi abuelita Imelda y a mi tía María Luisa por cuidarme siempre desde el cielo.

A mi directora de tesis, por haberme orientado en cada momento, no solamente en la elaboración de esta tesis, sino por estar ahí para escucharme, motivarme y darme los mejores consejos de vida. Gracias por ser la mejor asesora y por haberme introducido al increíble y apasionante mundo de las micotoxinas, sin duda alguna, haberla elegido a usted como mi asesora fue la mejor decisión del mundo.

A mi comité tutorial, agradezco a la Dra. Edith y a la Dra. Marcia por su apoyo, tiempo, conocimiento y dedicación para enriquecer la presente investigación. Quiero agradecer al Dr. Gerardo por haberme introducido al mundo de los hongos y por haberme brindado un espacio dentro de su laboratorio, de igual manera, agradezco al Dr. Nacho por orientarme en lo referente a la clínica en pequeñas especies, por compartirme de su conocimiento y por confiar en mí en esta etapa tan importante.

A la doctora Lolita, por motivarme en cada paso de la vida hasta convertirse en mi soporte en los momentos felices y difíciles, por su amor, comprensión y por ser la mejor consejera de vida. ¡Le agradezco creer siempre en mí!

A mis amigas del laboratorio, Fani y Annel, gracias por todas esas horas interminables en las que estuvimos juntas trabajando, por motivarme, escucharme y animarme cuando las cosas no salían como esperaba. A Aranzis, gracias por ser la mejor amiga de laboratorio y emocionarte a mi lado al obtener resultados después de largas horas de trabajo y por siempre ayudarme a resolver mis problemas experimentales. A Karlita por toda su paciencia y por enseñarme con amor muchas de las técnicas necesarias para elaborar mi tesis, gracias por siempre salvarme la vida.

A mis amigas y compañeras de laboratorio de desarrollo analítico, Bety y Yuri. Gracias por ayudarme con mis experimentos y por estar siempre al pendiente de mi proyecto, y sobre

todo por hacer más amenas las horas en el laboratorio con café y pan. ¡Son las mejores hermanitas!

A mis amigos de toda la vida, que con su apoyo me motivan a ser perseverante con mis sueños y metas.

“El éxito en la vida no se mide por lo que logras sino por los obstáculos que superas”.

Jaime Cardoso



ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUCCIÓN	15
2. MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 GENERALIDADES DE OCRATOXINA A (OTA)	17
2.1.1. Descripción.....	17
2.1.2. Estructura química y formación.....	17
2.2 SÍNTESIS DE LA OTA EN HONGOS.....	18
2.3 CONDICIONES AMBIENTALES QUE FAVORECEN EL CRECIMIENTO DE HONGOS MICOTOXIGÉNICOS	20
2.4 CONTAMINACIÓN DE ALIMENTOS POR OTA.....	21
2.4.1 Consumo de alimentos comerciales para caninos y su formulación.....	22
2.4.2 Contaminación de alimentos extruidos para perros.....	24
2.5 ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA EN CANINOS	25
2.6 FORMAS DE EXPOSICIÓN A OTA	28
2.7 ASPECTOS TÓXICOS DE LA OTA	28
2.7.1 Toxicidad aguda.....	29
2.7.2 Toxicidad crónica	29
2.7.3 Toxicocinética	29
2.7.4 Toxicodinamia.....	33
2.8 LEGISLACIÓN	35
2.9 DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE OTA.....	36
2.9.1 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).....	37
2.9.2 Evaluación de la exposición a OTA.....	38
2.9.3 Estimación de la exposición externa a OTA	39
2.9.4 Métodos para determinar la frecuencia de ingesta de alimentos	39
3. JUSTIFICACIÓN.....	41
4. HIPÓTESIS.....	42
5. OBJETIVOS	42
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	42
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	42
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	43
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
7.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	44
7.2 MUESTRA	44



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



7.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	44
7.4 CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	44
7.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	45
7.6 VARIABLES.....	45
7.7 INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN.....	46
7.8 PROCEDIMIENTO METODOLÓGICO.....	47
7.9 ANÁLISIS DE DATOS.....	52
8. RESULTADOS.....	53
8.1 CARACTERÍSTICAS DEL ALIMENTO EXTRUIDO.....	53
8.2 RECuento DE HONGOS Y LEVADURAS EN ALIMENTO COMERCIAL DE EMPAQUE SELLADO Y A GRANEL.....	57
8.3 INCIDENCIA DE HONGOS OCRATOXIGENICOS EN MUESTRAS DE ALIMENTO COMERCIAL DE EMPAQUE SELLADO Y A GRANEL.....	63
8.4 DETERMINACIÓN DE OTA EN MUESTRAS DE ALIMENTO COMERCIAL EXTUIDO POR LA TÉCNICA DE ELISA.....	69
8.5 INCIDENCIA DE AISLAMIENTOS FÚNGICOS Y CONCENTRACIÓN DE OTA EN ALIMENTOS EXTRUIDOS.....	73
8.6 DETERMINACIÓN DE OTA EN MUESTRAS DE SUERO SANGUÍNEO POR LA TÉCNICA DE ELISA.....	75
8.7 ESTIMACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A OTA MEDIANTE LA FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS.....	76
9. DISCUSIÓN.....	79
10. CONCLUSIÓN.....	89
11. PERSPECTIVAS.....	90
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
13. ANEXOS.....	102
13.1 CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	102
13.2 CUESTIONARIO DE LA HISTORIA CLÍNICA DEL PACIENTE.....	103
13.3 CUESTIONARIO DE NUTRICIÓN Y ALIMENTACIÓN DE CANINOS DOMÉSTICOS.....	105



ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA QUÍMICA DE OCRATOXINA A Y SUS PRINCIPALES METABOLITOS.....	18
FIGURA 2. PREFERENCIA DE MASCOTAS EN MÉXICO.....	22
FIGURA 3. TIPO DE ALIMENTACIÓN MÁS FRECUENTE EN CANINOS EN MÉXICO	22
FIGURA 4. VÍAS METABÓLICAS DE LA OTA EN ANIMALES Y HUMANOS	31
FIGURA 5. MODELO DEL MECANISMO DE NEFROTOXICIDAD DE LAS OCRATOXINAS INDUCIDO PRINCIPALMENTE POR LA OCRATOXINA A.....	34
FIGURA 6. DIFERENTES ESQUEMAS DE TIPOS DE ELISA	37
FIGURA 7. PRINCIPIO DE ELISA COMPETITIVO DIRECTO PARA EL ANÁLISIS DE MICOTOXINAS. ESQUEMA DE INMUNOENSAYO EN EL POCILLO ELISA.....	38
FIGURA 8. PORCENTAJE DE MUESTRAS DE ALIMENTO EXTRUIDO FORMULADAS A BASE DE CEREALES	53
FIGURA 9. CLASIFICACIÓN DE ALIMENTO SECO PARA PERRO EN BASE A LA PROFECO.....	53
FIGURA 10. PORCENTAJE DE CEREALES MENORES EMPLEADOS PARA LA ELABORACIÓN DE ALIMENTOS EXTRUIDOS LIBRES DE GRANO	54
FIGURA 11. PORCENTAJE DE CEREALES EMPLEADOS EN LA FORMULACIÓN DE ALIMENTOS EXTRUIDOS DE ACUERDO CON EL EMPAQUETADO	54
FIGURA 12. MUESTRAS DE ALIMENTOS EXTRUIDOS ENRIQUECIDOS CON PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS.....	55
FIGURA 13. FRECUENCIA DE CONSERVADORES REPORTADOS EN LAS MUESTRAS DE ALIMENTOS EXTRUIDO	55
FIGURA 14. PORCENTAJE DE ANTIOXIDANTES IDENTIFICADOS EN LAS MUESTRAS DE ALIMENTO EXTRUIDO	55
FIGURA 15. VARIACIONES DE pH EN MUESTRAS DE ALIMENTO EXTRUIDO EN EMPAQUE SELLADO.....	57
FIGURA 16. VARIACIONES DE pH EN MUESTRAS DE ALIMENTO EXTRUIDO A GRANEL	57
FIGURA 17. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA SIN ANTIBIÓTICO DE MUESTRA DIRECTA DE ALIMENTO EXTRUIDO EN EMPAQUE SELLADO.....	58
FIGURA 18. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA SIN ANTIBIÓTICO DE MUESTRA DIRECTA DE ALIMENTO EXTRUIDO A GRANEL	58



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



FIGURA 19. DESARROLLO MACROSCÓPICO DE COLONIAS DE HONGOS FILAMENTOSOS EN MUESTRAS DIRECTAS DE EMPAQUE SELLADO EN PDA SIN ANTIBIÓTICO.....	59
FIGURA 20. DESARROLLO MACROSCÓPICO DE COLONIAS DE HONGOS FILAMENTOSOS EN MUESTRAS DIRECTAS A GRANEL EN PDA SIN ANTIBIÓTICO	59
FIGURA 21. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA CON ANTIBIÓTICO DE MUESTRA DIRECTA DE ALIMENTO EXTRUIDO EN EMPAQUE SELLADO.....	60
FIGURA 22. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA CON ANTIBIÓTICO DE MUESTRA DIRECTA DE ALIMENTO EXTRUIDO A GRANEL	60
FIGURA 23. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA SIN ANTIBIÓTICO DE SUSPENSIÓN PRIMARIA DE ALIMENTO EXTRUIDO EN EMPAQUE SELLADO	61
FIGURA 24. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA SIN ANTIBIÓTICO DE SUSPENSIÓN PRIMARIA DE ALIMENTO EXTRUIDO A GRANEL	61
FIGURA 25. DESARROLLO MACROSCÓPICO DE COLONIAS DE HONGOS FILAMENTOSOS EN SUSPENSIÓN PRIMARIA DE MUESTRAS EN EMPAQUE SELLADO EN PDA SIN ANTIBIÓTICO.....	61
FIGURA 26. DESARROLLO MACROSCÓPICO DE COLONIAS DE HONGOS FILAMENTOSOS EN SUSPENSIÓN PRIMARIA DE MUESTRAS A GRANEL EN PDA SIN ANTIBIÓTICO	61
FIGURA 27. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA CON ANTIBIÓTICO DE SUSPENSIÓN PRIMARIA DE ALIMENTO EXTRUIDO EN EMPAQUE SELLADO	62
FIGURA 28. FRECUENCIA DE UFC DE HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN SIEMBRA CON ANTIBIÓTICO DE SUSPENSIÓN PRIMARIA DE ALIMENTO EXTRUIDO A GRANEL	62
FIGURA 29. INCIDENCIA DE OTA EN MUESTRAS DE ALIMENTO COMERCIAL EXTRUIDO PARA PERROS	69
FIGURA 30. COMPARATIVA DE OTA PRESENTE EN MUESTRAS DE ALIMENTO DE EMPAQUE SELLADO Y EMPAQUE A GRANEL	70
FIGURA 31. INCIDENCIA DE OTA EN ALIMENTO EXTRUIDO EN EMPAQUE SELLADO DE CALIDAD ESTÁNDAR Y PREMIUM/SÚPER PREMIUM	71
FIGURA 32. INCIDENCIA DE OTA EN ALIMENTO EXTRUIDO A GRANEL DE CALIDAD ESTÁNDAR Y PREMIUM/SÚPER PREMIUM.....	71
FIGURA 33. ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS MUESTRAS EN EMPAQUE SELLADO CATALOGADAS EN BASE A LA CLASIFICACIÓN DE LA PROFECO.....	72



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



FIGURA 34. ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS MUESTRAS A GRANEL CATALOGADAS EN BASE A LA CLASIFICACIÓN DE LA PROFECO 72

FIGURA 35. EVALUACIÓN DE LAS MEDIAS DE LA CONCENTRACIÓN DE OTA EN PACIENTES CLÍNICAMENTE SANOS EN COMPARACIÓN CON LOS PACIENTES CON ERC 75

FIGURA 36. CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LA CREATININA Y LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE OTA EN PACIENTES CANINOS CON ERC 76

FIGURA 37. CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LA UREA Y LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE OTA EN PACIENTES CANINOS CON ERC 76

FIGURA 38. CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE OTA EN ALIMENTO CONSUMIDO Y LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE OTA EN CANINOS SANOS..... 78

FIGURA 39. CORRELACIÓN DE SPEARMAN ENTRE LA CONCENTRACIÓN DE OTA EN ALIMENTO CONSUMIDO Y LA CONCENTRACIÓN SANGUÍNEA DE OTA EN CANINOS CON ERC 78



ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. CONCENTRACIÓN DE OCRATOXINA A EN GRANOS DE CEREALES	21
TABLA 2. VALORES NORMALES DE LAS PRUEBAS CLÍNICAS DE LA FUNCIÓN GLOMERULAR... 26	
TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA SEGÚN LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE INTERÉS RENAL	27
TABLA 4. NIVELES MÁXIMOS EN PRODUCTOS PARA ALIMENTACIÓN ANIMAL.....	36
TABLA 5. VALORES ESTANDARES DE OTA EN VIALES Y EN MATERIA PRIMA DEL KIT COMERCIAL DE HELICA ®.....	51
TABLA 6. VALORES ESTANDARES DE OTA EN VIALES Y EN MUESTRA DE SUERO DEL KIT COMERCIAL DE HELICA ®.....	52
TABLA 7. MARCAS DE MUESTRAS DE ALIMENTO EXTRUIDO PARA PERROS EN EMPAQUE SELLADO.....	56
TABLA 8. MARCAS DE MUESTRAS DE ALIMENTO EXTRUIDO PARA PERROS A GRANEL	56
TABLA 9. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS PRINCIPALES HONGOS FILAMENTOSOS PRESENTES EN EL ALIMENTO EXTRUIDO EN EMPAQUE SELLADO Y A GRANEL.....	63
TABLA 10. RESUMEN DE LA INCIDENCIA DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS FÚNGICOS IDENTIFICADOS EN LAS MUESTRAS ANALIZADAS Y SU CONCENTRACIÓN DE OTA EN EL ALIMENTO.....	73
TABLA 11. ANÁLISIS DE LOS CUESTIONARIOS SOBRE LA HISTORIA DIETÉTICA Y FRECUENCIA DE INGESTA DE ALIMENTOS QUE CONSUMEN LOS CANINOS MUESTREADOS.....	77



ABREVIATURAS

AF	Aflatoxina
ATP	Adenosín Trifosfato
BUN	Nitrógeno ureico en sangre
CE	Comunidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
Clr	Aclaramiento renal
CONAFAB	Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal
CONAPO	Consejo Nacional de Población
DL ₅₀	Dosis letal media
DON	Deoxinivalenol
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELIKA	Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ERC	Enfermedad Renal Crónica
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FB	Fumonisina
FDA	Food and Drug Administración
GSH	Glutación reducido
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IED	Ingesta Estimada Diaria
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IRIS	Sociedad Internacional de Interés Renal
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NEB	Nefropatía Endémica de los Balcanes
NK	Células asesinas naturales
NOM	Norma Oficial Mexicana
Nrf2	Factor nuclear eritroide-2
OH-OTA	Hidroxi-Ocratoxina A
OMS	Organización Mundial de la Salud
OT	Ocratoxina
OTHQ	OT-Hidroquinona
OTQ	OT-Quinona
SDMA	Dimetilarginina Simétrica
SNC	Sistema Nervioso Central
SPR	Resonancia de Plasmon Superficial
TFC	Tasa de filtración glomerular
TLC	Cromatografía en capa fina
Trna	Ácido ribonucleico de transferencia
UPC	Proporción proteína-creatinina en orina
ZEA	Zearalenona



RESUMEN

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por especies fúngicas de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, las cuales presentan actividad nefrotóxica e inmunosupresora, siendo la más tóxica y frecuente la ocratoxina A (OTA). El riesgo potencial del consumo de micotoxinas por animales de compañía ha cobrado importancia debido al aumento de alimentos extruidos para mascotas. Aunque los perros pertenecen al Orden Carnívora, los alimentos extruidos para mascotas suelen contener cantidades relativamente altas de cereales y subproductos de cereales desde el proceso de extrusión. En otras especies animales, la OTA ocasiona enfermedad renal crónica; sin embargo, las dosis consideradas tóxicas o letales para perros no se han informado en la literatura clínica. El objetivo de este estudio fue determinar el grado de contaminación por OTA en alimentos extruidos comerciales para caninos domésticos y su correlación con su concentración plasmática para permitir conocer su grado de exposición a OTA de las mascotas dentro del estado de Michoacán. Se usaron dos tipos de muestras: muestras de diversas marcas de alimentos comerciales extruidos en empaque sellado y a granel disponibles en establecimientos comerciales de la ciudad de Morelia, Michoacán y muestras sanguíneas de caninos domésticos que hayan sido alimentados con dichos tipos de alimentos. La etapa de muestreo duró un lapso de 6 meses, en los que se seleccionaron distintas marcas comerciales de alimentos extruidos, de las cuales se obtuvieron muestras representativas para ser sometidas a un proceso de homogeneización. Se acudió a diversas clínicas, hospitales y laboratorios clínicos veterinarios, con la finalidad de obtener muestras de pacientes caninos clínicamente sanos y con enfermedad renal crónica diagnosticada, que consumían alimentos comerciales extruidos. Se cuantificaron hongos ocratoxigénicos y levaduras en alimento extruido. Para la extracción de OTA se empleó metanol como disolvente y se procedió con la aplicación del método de inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo directo, con el fin de determinar y cuantificar los valores de OTA en alimento comercial y en suero. Los resultados obtenidos de OTA en los alimentos comerciales se correlacionaron con la concentración plasmática de OTA en pacientes caninos. Se determinó la presencia de hongos filamentosos en muestras de un gramo de alimento extruido, encontrando que la mayoría dieron positivo, siendo las de marcas conocidas a granel las de mayor frecuencia de poblaciones fúngicas. Por otro lado, la totalidad de las muestras de alimentos extruidos y de pacientes clínicamente sanos y con enfermedad renal crónica, fueron positivas a la presencia de OTA encontrando una correlación altamente positiva, lo cual indica que los alimentos extruidos contribuyen con ocasionar daño renal en las mascotas que lo consumen.

Palabras clave: Micotoxinas, nefrotoxicidad, hongos, contaminación, alimentos extruidos.



ABSTRACT

Ochratoxins are mycotoxins produced by fungal species of the *Aspergillus* and *Penicillium* genera, which are known due to their nephrotoxic and immunosuppressive activity; the most toxic and frequent is ochratoxin A (OTA). The potential risk of mycotoxin consumption by companion animals has gained importance due to the increase in extruded pet food. Although dogs belong to the Order Carnivora, extruded pet food often contain relatively high amounts of cereals and cereal by-products from the extrusion process. In other animal species, OTA causes chronic kidney disease; however, doses considered toxic or lethal to dogs have not been reported in the clinical literature. The objective of this study was to determine the degree of OTA contamination in commercial extruded food for domestic canines and its correlation with their plasma concentration to determine the degree of exposure to OTA in the state of Michoacán. Two types of samples were used: samples of different brands of commercial extruded food in sealed package and in bulk, available in commercial establishments in the city of Morelia, Michoacán, and blood samples from domestic canines that have been fed with these types of food. The sampling stage lasted 6 months, during which different commercial brands of extruded food were selected. Representative samples were obtained and were grinded to reduce their particle size. Several clinics, hospitals and veterinary clinical laboratories were visited in order to obtain samples from clinically healthy canine patients and patients with diagnosed of chronic renal disease, who consume commercial extruded food. Ochratoxigenic fungi and yeasts were quantified in extruded food. For OTA extraction, methanol was used as solvent and the direct competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) method was applied to determine and quantify OTA in commercial feed and serum. The results obtained for OTA in commercial food were correlated with the plasma concentration of OTA in canine patients. The presence of filamentous fungi was determined in g samples of extruded food and it was found that most of them were positive. Samples with the highest frequency of fungal populations, were those of known brands sold in bulk. On the other hand, all extruded food samples and blood samples from all canine patients were positive for the presence of OTA. There was a high positive correlation between OTA concentration in food samples and in blood samples, which indicates that extruded food contributes to kidney damage in pets that consume such kind of food.

Key words: Mycotoxins, nephrotoxicity, fungi, contamination, extruded foods.



1. INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), México es el país de la región de América Latina con el mayor número de perros en la región. En los resultados de la primera Encuesta Nacional de Bienestar Autorreportado (ENBIARE) (2021), se determinó que el 69.8% de los hogares en México cuentan con algún tipo de mascotas y 43.8 millones de ellas son caninos. Asimismo, el Consejo Nacional de Población (CONAPO, 2018) reveló que el número de perros domésticos aumentó en un 20% del año 2008 al 2018. En la mayor parte de los países occidentales, el número de hogares que cuentan con perros ha crecido significativamente en las últimas décadas, debido a que las personas los refieren como miembros de su familia, buscando activamente mantener esta relación a través de considerables esfuerzos emocionales (Serpell, 2016; Díaz & Rodríguez, 2019). En el mercado de los alimentos para mascotas, los dueños muestran un gran interés en alimentar correctamente a su perro; sin embargo, una buena parte de la mercadotecnia ha manipulado los conceptos de nutrición canina a la conveniencia de sus marcas (Águila, 2015).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estima que una cuarta parte de los alimentos producidos a nivel mundial se encuentran contaminados con micotoxinas, causando pérdidas económicas significativas y que representan una seria amenaza para la salud humana y animal (Bryden, 2012; Vasanthi & Bhat, 1998). Los límites regulatorios para las micotoxinas comunes han sido recomendados por organizaciones como la Food and Drug Administración (FDA) de Estados Unidos y por la Unión Europea. Las micotoxinas son productos secundarios, altamente tóxicos, del metabolismo de los hongos y se encuentran en alimentos convencionales como los cereales. Están relacionadas con diversos efectos adversos en la salud humana y animal. Las micotoxinas comúnmente implicadas y asociadas con problemas de salud animal incluyen a la aflatoxina (AF), la fumonisinas (FB), la ocratoxina A, los tricotecenos y la zearalenona (ZEA) (Boermans & Leung, 2007).

En México, existen diversas marcas comerciales de alimentos estándar y premium que aseguran cumplir los requerimientos nutricionales de las mascotas, con un buen control de calidad. Sin embargo, se desconoce si realmente se emplean ingredientes de calidad para garantizar alimentos libres de micotoxinas. En Austria y Polonia, se realizó un estudio para investigar la presencia de OTA en alimentos comerciales extruidos para mascotas, detectándola en el 47% de



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



las muestras (Razzazi-Fazeli *et al.*, 2001). Dicho trabajo no es reciente, y a la fecha son pocos los estudios de OTA en alimento para caninos, sin ningún reporte para el caso de México.

Las micotoxinas presentan un riesgo significativo para los seres humanos y los animales debido a que los granos de cereales y el alimento animal son colonizados por hongos toxigénicos. Algunos de los riesgos clínicos reportados en caninos, con relación al tipo de micotoxina que se consume, incluyen a la anorexia, debilidad, complicaciones gastrointestinales, daño renal y hepático, trastornos hormonales, infertilidad, afectaciones al SNC, efectos cancerígenos o inclusive la muerte (Puschner, 2002). La ocratoxina A es una potente nefrotoxina producida por hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, dentro del grupo de los ascomicetos, la cual se encuentra comúnmente en granos de cereales almacenados en una gran variedad de climas (López de Cerain *et al.*, 2000; Duarte *et al.*, 2010a). Una de las propiedades toxicocinéticas más significativas de la OTA es su alta afinidad por las proteínas plasmáticas, lo que determina su larga persistencia en el organismo (Bolet & Socarrás, 2005). La ingestión de alimentos contaminados da lugar a la aparición de un efecto tóxico renal en todas las especies de mamíferos monogástricos (Kuiper-Goodman & Scott, 1989). En los últimos años, las ocratoxinas y en particular la ocratoxina A, han recibido una especial atención, debido al elevado poder toxicológico. La OTA presenta un marcado carácter nefrotóxico, afectando a diferentes partes de la nefrona, dependiendo de la dosis y el tiempo de exposición. Entre los efectos de nefrotoxicidad provocados por su consumo se encuentran la poliuria, glucosuria, proteinuria y enzimuria. Se ha relacionado con enfermedades graves, como la “Nefropatía Endémica de los Balcanes” (NEB) o tumores en el tracto urinario en personas y la “Nefropatía Espontánea Porcina” o la “Nefropatía Aviar” en los animales, encontrando una concentración elevada de OTA en alimentos, plasma y orina (López de Cerain *et al.*, 2000). Considerando que la enfermedad renal en perros es común, es interesante conocer si alguna de las causas es el consumo de alimento contaminado con la OTA nefrotóxica y si existen muestras sanguíneas positivas a esta micotoxina.

En la presente investigación se pretende evaluar la contaminación por OTA en alimento comercial extruido, así como determinar la concentración plasmática para permitir conocer el grado de exposición a OTA en caninos domésticos dentro del estado de Michoacán.



2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de ocratoxina A (OTA)

2.1.1. Descripción

Las ocratoxinas son micotoxinas producidas por diversas especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (Malir *et al.*, 2016). Estas especies fúngicas producen siete tipos de toxinas, siendo la más tóxica y frecuente la ocratoxina A, la cual se encuentra presente en las contaminaciones primarias de muchos productos vegetales y de modo particular en cereales y legumbres de regiones geográficas tanto templadas como frías y húmedas (López de Cerain *et al.*, 2000; Castañeda, 2012; Duarte *et al.*, 2010a). En 1965, Van der Merwe y colaboradores detectaron y caracterizaron químicamente por primera vez a las ocratoxinas A, B y C, las cuales tienen actividad nefrotóxica e inmunosupresora. En los animales sensibles produce mortalidad por insuficiencia renal, además de ser carcinogénica y teratógena (Castañeda, 2012; Zhao *et al.*, 2017).

2.1.2. Estructura química y formación

La estructura química de las ocratoxinas contiene el aminoácido L-fenilalanina, unido mediante un enlace amida a un ácido dihidroisocumárico sustituido (Figura 1). Una característica notable de la estructura de la OTA es el sustituto de cloro (R^2 en la Figura 1), que parece ser importante para su toxicidad. La ocratoxina B (OTB) es la forma no clorada de la OTA, mientras que la ocratoxina C (OTC) representa el éster etílico. Otras micotoxinas relacionadas formadas en bajos niveles por hongos productores de OTA son los ésteres metílicos de OTA y OTB, ácido dihidroisocumárico libre (ocratoxina α , $OT\alpha$) y amidas de $OT\alpha$ con serina, hidroxiprolina y lisina (Malir *et al.*, 2016).

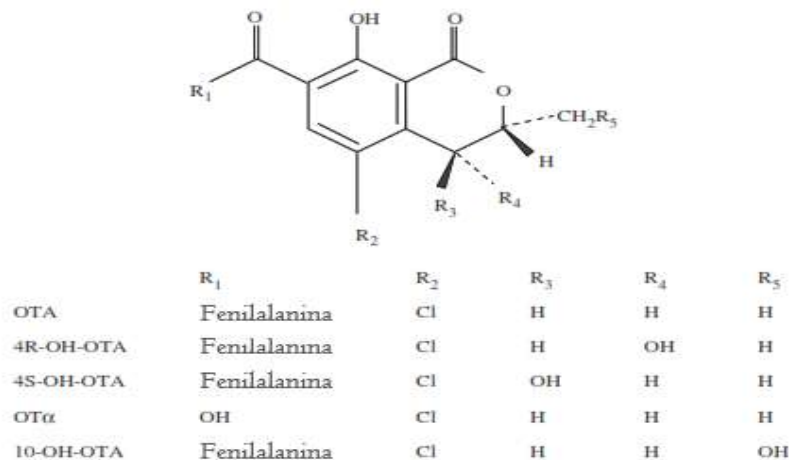


Figura 1. Estructura química de ocratoxina A y sus principales metabolitos (Dietrich, Heussner & O'Brien, 2005)

Aunque las vías biosintéticas de las ocratoxinas no se han establecido completamente, se sabe que la fracción de fenilalanina se origina en la vía del shikimato y la fracción de dihidroisocoumarina en la vía de los policétidos (pentacétida) (Heussner & Bingle, 2015). En relación con sus propiedades fisicoquímicas, la OTA es un compuesto sólido cristalino, inodoro y blanco con un punto de fusión de 168-173°C (Köszegi & Poor, 2016). Tiene una baja solubilidad en agua (aproximadamente 0.42 mg/L a 25 ° C) y una solubilidad moderada en disolventes orgánicos polares como el etanol y metanol, así como en disolventes apolares como el cloroformo. Debido a su grupo carboxílico y a su grupo hidroxilo fenólico, la OTA existe en formas no iónicas, monoaniónicas (OTA⁻) y dianiónicas (OTA²⁻) en solventes acuosos, dependiendo del pH. Sus valores de pKa son 4.3 y 7.2. Debido a su fracción de isocoumarina, la OTA presenta una fuerte fluorescencia después de la absorción de la luz ultravioleta, que depende fuertemente de pH (Steinbrück *et al.*, 2008).

2.2 Síntesis de la OTA en hongos

La ocratoxina A es producida por varias especies de hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*. Se consideran *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium verrucosum* y *P. viricatum*, los principales productores de ocratoxina A en alimentos debido a su gran facilidad de dispersión y crecimiento (Ravelo *et al.*, 2011).



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



Aspergillus es un género de hongos filamentosos, hialinos, saprofitos, ubicuos, pertenecientes al phylum *Ascomycota*. Este moho está formado por hifas hialinas y tienen reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de las ascas) y reproducción asexual (con formación de conidios). El hongo es un contaminante habitual de alimentos almacenados (granos y cereales), cuyas condiciones óptimas para la producción de micotoxinas son 25 °C y una humedad relativa del 95 % (Serrano & Cardona, 2015). Al ser un hongo del suelo que se reproduce mediante conidias asexuales la principal fuente de inóculo es el suelo, pero la estructura predominante de resistencia es desconocida. Se ha sugerido que el hongo sobrevive en conidias, micelio y esclerocios. Las conidias son las estructuras infectivas capaces de colonizar a las plantas mediante el viento o los insectos (Arrúa *et al.*, 2013).

Los hongos del género *Aspergillus* puede desarrollarse en tejidos vegetales vivos, en descomposición o en restos animales. Su población, tanto en la planta como en el suelo, depende de su capacidad de competir con la microbiota presente (Arrúa *et al.*, 2013). Las especies de *Penicillium* son consideradas como contaminantes habituales de diferentes substratos y pueden presentar la capacidad de producir diversas micotoxinas. La mayoría de las especies se les considera saprófitas, existiendo pocas que se aislen rutinariamente como patógenas oportunistas. Estas especies forman colonias que crecen de manera rápida, están formadas por densas agrupaciones de conidióforos y la mayoría presentan coloraciones verdosas (Soriano *et al.*, 2015).

En general, las especies de *Penicillium* son estrictamente aeróbicas, nutricionalmente poco exigentes y capaces de crecer en una amplia gama de entornos físicoquímicos, pero algunas de ellas están altamente especializadas, como frugívoros, en alimentos con bajo contenido en agua, y a baja tensión de oxígeno. Son hongos de crecimiento rápido, que producen un elevado número de esporas exógenas de paredes secas que se diseminan fácilmente por el aire (Perrone & Susca, 2016).

La mayoría de las especies de *Penicillium* son capaces de producir micotoxinas, pero sobre todo en condiciones de laboratorio. El conocimiento actual de las especies de *Penicillium* transmitidas por los alimentos permite predecir qué hongos y micotoxinas podrían estar presentes en un determinado producto alimentario almacenado en condiciones conocidas (Perrone & Susca, 2016).



2.3 Condiciones ambientales que favorecen el crecimiento de hongos micotoxigénicos

Los alimentos que típicamente pueden ser alterados por mohos son muy diversos, entre los que destacaremos los cereales, semillas oleaginosas, frutas y legumbres como productos cárnicos y lácteos fermentados, frutos secos, pasas, especias, y productos de panadería, entre otros. Estos productos se caracterizan por tener bien un valor de actividad de agua bajo, o bien por tener un pH bajo. Estos factores, junto con el tipo de contaminación, parecen ser los determinantes de que los mohos sean capaces de desplazar a las bacterias y levaduras en la carrera por colonizar el alimento (Soriano del Castillo, 2015).

Son muchos los factores que intervienen en el proceso de proliferación fúngica y de la contaminación con micotoxinas. Los principales factores son: temperatura y humedad, tipo de suelo, la susceptibilidad del cultivo y de la variedad de que se trate, la madurez de los granos en el momento de la cosecha, los daños mecánicos o los producidos por insectos y/o pájaros sobre el cereal, el tipo de almacenamiento (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015). Las prácticas agrícolas y las condiciones medioambientales (humedad y temperatura) afectan de forma directa a los niveles de OTA en los alimentos. Asimismo, se ha demostrado que una alta actividad de agua favorece la producción de OTA en los alimentos (Ravelo *et al.*, 2011).

La Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria, ELIKA (2013), menciona que es importante destacar que a valores óptimos de humedad (95-99%) y de temperatura, la especie *A. ochraceus* puede producir OTA a temperaturas entre 12-37°C y *P. verrucosum* entre 4-31°C. Particularmente, la ocratoxina A es muy estable, y resistente a altas temperaturas (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria ELIKA, 2013). Las condiciones climáticas tienen un papel crucial en la formación de estas micotoxinas y por ello, la gravedad del problema varía de año en año. Una situación particularmente problemática para los productores de cereales se da cuando tras un periodo de sequía (que lleva a las plantas a sufrir estrés hídrico) le siguen lluvias (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015).

Los mohos, durante su crecimiento sobre el alimento toman de éste todo aquello que necesitan, tanto para su desarrollo como para producir la energía necesaria para llevar a cabo sus procesos vitales. Esto provoca en el alimento una serie de cambios o alteraciones, como la disminución de su valor nutritivo, cambios en su calidad organoléptica que afectan a la apariencia



del alimento (ya sea en su olor, color, sabor y textura), la disminución de la capacidad de germinación en semillas, la pérdida de materia seca como consecuencia de la absorción de nutrientes y agua del grano por parte del micelio fúngico, y la producción de sustancias que pueden tener diversas actividades biológicas (Soriano del Castillo, 2015).

2.4 Contaminación de alimentos por OTA

La ocratoxina A contamina gran variedad de productos alimenticios, de los cuales los cereales como el trigo, la cebada, el maíz, la avena y el centeno, son los más vulnerables. Aunque se encuentra también en alimentos de origen tropical (como es el café y cacao), en bebidas (como el mosto, vino y cerveza), y alimentos de origen animal, como consecuencia de la alimentación del animal con pienso contaminado con ocratoxina, provocando a largo plazo una toxicidad crónica en el ser humano y animales al consumir dichos alimentos con altas concentraciones de ocratoxina A (Ngundi *et al.*, 2005; Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria ELIKA, 2013). Normalmente, la OTA se produce donde se dan las condiciones necesarias para el crecimiento de las especies fúngicas con capacidad de sintetizarla. Se pueden encontrar hasta 5 tipos de ocratoxinas, siendo la más tóxica la OTA seguida de la OTB y OTC (Richard, 2007).

Los cereales constituyen la principal fuente de ingesta dietética de OTA, aportando alrededor del 50% del total de la ingesta (Tabla 1). Diversos autores aseguran que la presencia de OTA en los cereales se debe principalmente a las condiciones del grano en la cosecha, la realización de las diferentes operaciones de desecación y a la calidad del almacenamiento (Ravelo *et al.*, 2011). Estas toxinas no pueden ser completamente evitadas o eliminadas de los alimentos por los procesos agronómicos y de manufactura, por lo que son consideradas contaminantes inevitables (Sharma & Márquez, 2001). Asimismo, han sido asociadas a sustanciales pérdidas agrícolas y económicas, estimándose que las micotoxinas contaminan un cuarto de las cosechas mundiales (Bingham, 2003).

Tabla 1. Concentración de ocratoxina A en granos de cereales (Ravelo *et al.*, 2011)

Cereal en grano	Media (ug/kg)	Intervalo (ug/kg)
Trigo	0.3	0.3-231
	1.47	N.D-1.4
	267	0.60-1024
	0.3	N.D-32
	19.6	N.D-66
	0.42	N.D-1.73
Cebada	55	N.D-250
	-	0.3-117
	0.3	0.3
	5.45	1.20-9.70
	0.8	N.D-0.9
	17.2	N.D-164
Maiz	0.17	0.04-0.80
	96	N.D-940
	1.7	N.D-5.2
	1.47	N.D-2.54
	44	27-64
	266	3-1.738
Sorgo	1.08	N.D-7.22
	174.8	N.D-2106
	117	8-950
Centeno	1.38	0.82-2.5
	6.75	4.73-8.80
	0.9	N.D-63
Arroz	1.05	N.D-1.59
	23.75	N.D-26.2
	-	N.D-3.52
	0.75	N.D-2.78
	4.15	N.D-32.4
	1.4	N.D-2.3
44	N.D-150	
-	N.D-12.5	

N.D: Limite de Concentración No Detectado



2.4.1 Consumo de alimentos comerciales para caninos y su formulación

En una encuesta realizada en México en la cual participaron 2 mil 151 personas, el 70.7% de sus participantes indicaron que dentro de sus hogares hay perros (Figura 2), y el 56% señaló que adquieren croquetas secas para sus mascotas (Figura 3) (Jaramillo, 2017a; Jaramillo, 2017b). Asimismo, el Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal, A.C. (CONAFAB, 2019), estimó un consumo nacional de alimento para animales de compañía de 1,111 miles de toneladas al año.

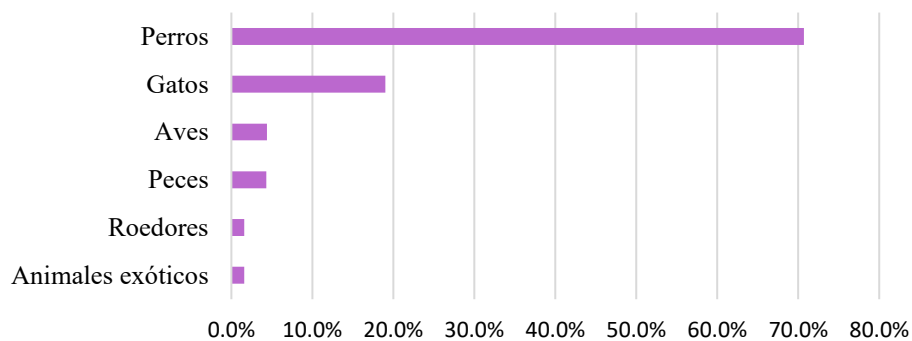


Figura 2. Preferencia de mascotas en México (Jaramillo, 2017a)

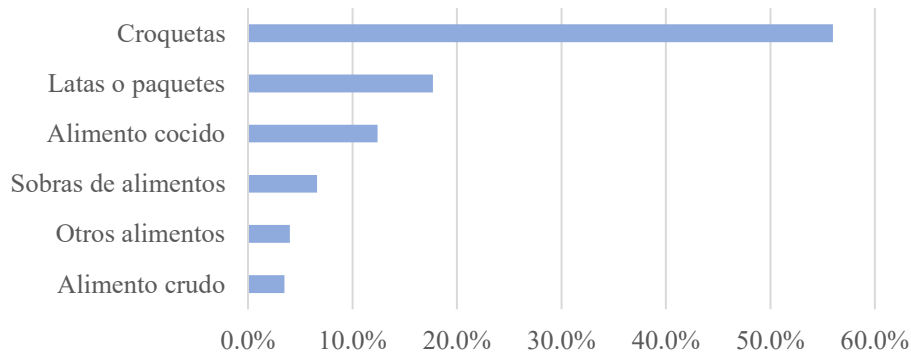


Figura 3. Tipo de alimentación más frecuente en caninos en México (Jaramillo, 2017b)

La Procuraduría Federal del Consumidor (PROFECO) (2015), elaboró una clasificación de los alimentos de acuerdo con sus características nutricionales y atributos especiales:

- Alimento seco para perro adultos “Tipo AB”. Cubre los requerimientos nutricionales indispensables del perro adulto y está enfocado principalmente a que el canino lo consuma y satisfaga su apetito.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Alimento seco para perros adultos “Tipo AE”. Cubre los requerimientos nutricionales indispensables del perro adulto y además incluye algunas vitaminas y minerales para la nutrición.
- Alimento seco para perros adultos “Tipo AP”. Los alimentos cumplen los requerimientos mínimos de nutrición, incluyen vitaminas y minerales en su fórmula, e ingredientes funcionales que generan beneficios adicionales: mayor digestibilidad, mejor sabor, piel sana y pelo brillante.
- Alimento seco para perros adultos “Tipo AS”. Es un alimento especializado: su formulación cubre los requerimientos nutricionales de las diferentes razas.

La mayor parte de los alimentos secos existentes en el mercado son sometidos a un proceso de cocinado denominado “extrusión”. Durante este proceso, la mezcla de ingredientes es sometida a una humedad del 15-30% antes de ser introducidos en un circuito giratorio a alta temperatura, en el que la fricción causada por la presión aplicada hace que aumente la temperatura por encima de los 100 °C. La extrusión mediante molde a presión de 34 a 37 bares da lugar a que el agua hierva y en su paso por el sistema haga que la mezcla se expanda adquiriendo una textura lisa. Los gránulos se cortan al tamaño deseado y se someten a secado antes de ser recubiertos con grasa u otros preparados naturales que potencian el sabor del alimento (Witaszak *et al.*, 2019).

Las marcas de alimento para perro agregan, en mayor o menor medida, carbohidratos y, dependiendo de la fórmula, pueden utilizar maíz, trigo, arroz, cebada, sorgo, entre otros ingredientes. En algunos casos también incluyen fibras solubles como la inulina y los oligosacáridos, así como probióticos y prebióticos para ayudar al funcionamiento digestivo (PROFECO, 2015). Los productos de levadura viable se añaden generalmente a los alimentos para animales por sus potenciales efectos probióticos. La levadura viable más comúnmente utilizada en la industria de la alimentación animal es la levadura seca activa, que contiene aproximadamente un 95% de materia seca (Stone, 2006). La levadura seca activa también se encuentra en varios aditivos microbianos para piensos de alimentación directa. Los ingredientes para piensos producidos a partir de procesos de fermentación de levaduras en los piensos para animales ha aumentado drásticamente en los últimos años. Por lo tanto, hay muchos tipos de aditivos para piensos e ingredientes que contienen levadura en diversas formas, pero los nutricionistas de animales a menudo no están seguros de las diferencias únicas entre estos productos y sus posibles funciones en la nutrición y la salud de los animales. Además, a pesar de que los aditivos e



ingredientes de piensos que contienen levadura se han utilizado ampliamente en la industria de los piensos durante décadas, no existen métodos analíticos estándar para cuantificar la levadura y sus componentes químicos biológicamente importantes. Los productos de levadura viable se añaden generalmente a los alimentos para animales por sus potenciales efectos probióticos (Shurson, 2018).

2.4.2 Contaminación de alimentos extruidos para perros

Aunque los perros y los gatos pertenecen a la Orden Carnivora, los alimentos extruidos para mascotas suelen contener cantidades relativamente altas de cereales y subproductos de cereales desde el proceso de extrusión (Twomey *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de que las condiciones particulares de este procesamiento se caracterizan por emplear altas presiones y temperaturas, reducir la humedad de los alimentos y almacenar herméticamente al pellet para protegerlo de la contaminación y el desarrollo de hongos, no llegan a degradar/inactivar a las micotoxinas que posiblemente contaminan los ingredientes en bruto (Zwierzchowski *et al.*, 2004; Kaushik, 2013; Witaszak *et al.*, 2019).

La contaminación por hongos en alimentos concentrados causa serios problemas, dado que los tóxicos que producen disminuyen la calidad del alimento y al mismo tiempo la respuesta animal, causando con ello una baja producción (Chacón, 2005). Los hongos y/o sus toxinas pueden estar presentes en la materia prima, pero si durante el almacenaje no se manejan correctamente, el problema se agrava (Santibañez *et al.*, 2011). Por consiguiente, los alimentos extruidos para mascotas resultan en riesgo de contaminación, siendo las aflatoxinas, el deoxinivalenol (DON), la zearalenona, fumonisinas y la ocratoxina A las principales micotoxinas presentes (Razzazi-Fazeli *et al.*, 2001).

La industria procesadora de alimentos concentrados para animales debe garantizar que sus productos estén por debajo de los límites toxicológicos establecidos para micotoxinas. La mejor manera de evitar problemas de contaminación por las toxinas fúngicas es a través de la prevención. Desafortunadamente, muchas veces las medidas de prevención son insuficientes y se estima que gran parte de los granos del mundo se encuentren contaminados con micotoxinas (Maia & Pereira, 2002; Requena *et al.*, 2005).



Más allá de las consecuencias perjudiciales para los resultados económicos y la reputación en la industria de los alimentos, la contaminación por micotoxinas plantea graves riesgos para la salud de los animales domésticos y seres humanos, ya que la contaminación de los alimentos para animales puede ser más relevante en las mascotas de compañía debido a que se mantienen y alimentan por períodos de tiempo más largos que los animales de granja y, por lo tanto, son más vulnerables a la exposición crónica a los tóxicos. Aunque el conocimiento actual sobre los efectos toxicológicos en estas especies es limitado, la OTA puede ser un factor ambiental asociado con la enfermedad renal crónica (ERC) en animales y humanos (Boermans & Leun, 2007; Songsermsakul *et al.*, 2007; Meucci *et al.*, 2017).

2.5 Enfermedad renal crónica en caninos

La enfermedad renal crónica es una de las enfermedades renales más comunes en los perros y su etiología no está del todo aclarada. La ERC parece estar correlacionada con algunos factores de riesgo, como las enfermedades inmunomediadas, las infecciones sistémicas o del tracto urinario, la nefrolitiasis, la nefrotoxicidad de drogas o sustancias, la hipertensión sistémica y glomerular, la hipoperfusión crónica, la amiloidosis, entre otras (Polzin, 2011). Existen varias asociaciones bien conocidas entre la ERC y los agentes y condiciones ambientales, como los metales pesados, las micotoxinas, químicos industriales e infecciones. Los síntomas iniciales de la ocratoxicosis observados en todas las especies incluyen anorexia, polidipsia, poliuria y deshidratación, y están asociados con el daño renal. Al absorberse, la OTA entra en el sistema circulatorio, se une a las proteínas séricas y se acumula en los riñones, donde interrumpe la síntesis de proteínas y otras vías en las células tubulares proximales. Esto resulta en la degeneración de los túbulos proximales y las fibrosis intersticiales (Songsermsakul *et al.*, 2007).

Generalmente, la ERC en el perro progresa desde un estadio inicial no azotémico hasta un estadio terminal con síndrome urémico que desemboca en la muerte y/o eutanasia del paciente. En algunos casos, esta progresión ocurre muy rápidamente, en pocas semanas, mientras que en otras circunstancias la función renal se mantiene estable durante periodos de tiempo más largos y la enfermedad progresa a lo largo de varios años. En cualquier caso, y como la supervivencia del



paciente está relacionada con la precocidad del diagnóstico, resulta fundamental realizar un diagnóstico precoz de la ERC (Cortadellas, 2010).

El mejor modo de evaluar la función renal de modo global es mediante el cálculo de la tasa de filtración glomerular (TFG), ya que este parámetro está directamente relacionado con la masa funcional de los riñones (Di Bartola, 2005; Heine & Lefebvre, 2007). La TFG puede estimarse mediante las pruebas de aclaramiento o bien mediante la determinación de diversos marcadores indirectos de filtración glomerular. El aclaramiento se define como una constante de proporcionalidad que describe la relación entre la velocidad de transferencia de una sustancia en cantidad por unidad de tiempo y su concentración en orina y/o plasma; normalmente se expresa en mL/min/kg (Heine & Lefebvre, 2007). Entre las sustancias que han sido empleadas en pruebas de aclaramiento urinario o plasmático se incluyen la inulina, la creatinina endógena, la creatinina exógena, el iohexol y algunos isótopos radioactivos (Cortadellas, 2010; Heine & Lefebvre, 2007). Dada la dificultad para la realización de estos estudios, no son habituales en la práctica clínica diaria, y la valoración del TFG se suele hacer mediante marcadores indirectos, como la cuantificación del nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina sérica (Tabla 2) (Cortadellas, 2010). En animales con ERC de origen glomerular, la evaluación de la proteinuria permite hacer el diagnóstico antes de que se produzcan cambios en los indicadores plasmáticos de la enfermedad renal. Además, la proteinuria es un importante factor de pronóstico en relación con la progresión de ERC del perro. La proteinuria puede evaluarse mediante el cálculo de la proporción de proteína-creatinina en orina (UPC) (Cortadellas & Fernández-del Palacio, 2012).

Tabla 2. Valores normales de las pruebas clínicas de la función glomerular (Chew et al., 2011)

Parámetro (unidades)	Perro
Aclaramiento de creatinina exógena plasmática (mL/min/kg)	3-5
Creatinina sérica (mg/dL)	0.3-1.3
Nitrógeno ureico sanguíneo (BUN) (mg/dL)	8-25
UPC (ratio UPr/PCr) en orina	<0.4



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



En medicina veterinaria, desde el año 2015 se dispone de un nuevo parámetro de laboratorio denominado Dimetilarginina Simétrica (SDMA) (Idexx, 2015), el cual es un biomarcador de la función renal, que tiene la ventaja de detectar de forma temprana la disminución de la TFG, ya que su concentración sérica aumenta por encima de los valores de referencia cuando existe una disminución de las nefronas funcionales del 40% aproximadamente, la concentración sérica de creatinina lo hace cuando disminuye el 75% de las nefronas funcionales (Hall *et al.*, 2014; Yerramilli *et al.*, 2016). La SDMA se excreta a través de los riñones, por lo que a medida que disminuye la función renal o la TFG, aumenta la SDMA. Actualmente, la prueba IDEXX SDMA está disponible en IDEXX Reference Laboratories y en equipos para prueba Catalyst SDMA (Idexx, 2015). Dicha molécula es uno de los múltiples metabolitos que aparecen tras la degradación de la arginina, un aminoácido liberado como consecuencia de la degradación de la proteína intranuclear (Brown, 2015).

La gravedad de la ERC se determina en base a los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS), lo que permite estadificar la enfermedad (Tabla 3). Este sistema de clasificación distingue 4 estadios de ERC según la concentración de creatinina sérica y el biomarcador SDMA por el IRIS, como parámetro para la clasificación del estadio en la ERC (Cortadellas *et al.*, 2012).

Tabla 3. Clasificación de la enfermedad renal crónica según la Sociedad Internacional de Interés Renal (IRIS, 2019)

	Estadio 1 Sin azoemia (creatinina normal)	Estadio 2 Azotemia leve (creatinina normal o ligeramente elevada)	Estadio 3 Azotemia moderada	Estadio 4 Azotemia intensa
Creatinina en $\mu\text{mol/L}$ Estadio según la creatinina estable	Menos de 125 (1.4 mg/dL)	125 – 250 (1.4 – 2.8 mg/dL)	251 – 440 (2.9 – 5.0 mg/dL)	Mayor de 440 (5.0 mg/dL)
SDMA en $\mu\text{g/dL}$ Estadio según la SDMA estable	Menos de 18	18 – 35	36 – 54	Mayor de 54
Proporción UPC Estadificación basada en la proteinuria	Sin proteinuria <0.2 Proteinuria en el límite 0.2 – 0.5 Proteinuria >0.5			



2.6 Formas de exposición a OTA

La ocratoxina A puede entrar en la cadena alimenticia, transmitiéndose a los individuos mediante dos mecanismos:

- Directamente a través del consumo de alimentos vegetales, entre los que se incluyen cereales y productos a base de cereales, frutos secos, frutas y sus productos derivados.
- Indirectamente a través del consumo de productos derivados de animales que han consumido pienso contaminado con ocratoxina A (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria ELIKA, 2013).

El perro parece ser una especie que es particularmente vulnerable a esta micotoxina, por ejemplo, una dosis diaria de 0.2 mg de OTA/kg de peso corporal durante 2 semanas o una dosis única de 7.8 mg de OTA/kg de peso corporal resultó ser fatal para perros jóvenes de la raza beagle (Szczzech *et al.*, 1973a; Szczzech *et al.*, 1973b; Duarte *et al.*, 2010b).

2.7 Aspectos tóxicos de la OTA

De acuerdo con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (2020), la OTA es una micotoxina acumulativa con absorción y distribución relativamente rápidas, pero de biotransformación y excreción lenta.

Los niveles de micotoxinas en sangre y/u orina proporcionan una buena estimación de la exposición pasada y reciente, ya que la OTA se une a las proteínas del suero y también se excreta parcialmente por vía renal. Sin embargo, la medición de la OTA por sí sola no refleja su biotransformación (Meucci *et al.*, 2017).

La OTA afecta principalmente a los riñones, en los cuales puede originar efectos agudos y crónicos, en función de la dosis y la duración de la exposición, ya que se acumula en los tejidos renales. Su capacidad nefrotóxica ha sido demostrada en todas las especies de mamíferos en los que se ha evaluado. El perro y el cerdo resultan especialmente susceptibles (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015).



2.7.1 Toxicidad aguda

Los estudios sobre la toxicidad aguda de OTA arrojan diferentes grados de afectación según la especie animal de que se trate (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2015).

La DL₅₀ por vía oral presenta un intervalo entre 20-50 mg/kg en ratas y ratones y entre 0.2-1 mg/kg en perros, cerdos y pollos, que son las especies más sensibles. Los síntomas de una intoxicación aguda consisten en pérdida de peso, poliuria, polidipsia y hemorragias multifocales en los principales órganos y trombos de fibrina en los órganos de mayor actividad metabólica (bazo, cerebro, hígado, riñón y corazón), así como nefrosis y necrosis hepáticas (López de Cerain, 2007). El efecto tóxico inicial de la ocratoxina A en el riñón promueve procesos inflamatorios como un medio de citoprotección, esta afectación incluye el sistema monocito- macrófago, linfocitos T y células asesinas naturales (NK), con elevación de IL-1b, IL-8, además de aumento de la inmunoglobulina M (IgM) y E (IgE) (Raghubeer *et al.*, 2017).

2.7.2 Toxicidad crónica

La toxicidad crónica de la OTA se traduce en una nefropatía intersticial en los animales de granja como pollos y cerdos, conocidas como nefropatías aviares y porcinas, respectivamente. La inflamación persistente en el riñón causa daño tubulointersticial, disminución en su funcionalidad y eventualmente fibrosis (Rodríguez *et al.*, 2005). Además, la OTA constituye el principal factor determinante del desarrollo de tumores en el tracto urinario humano, así como de la "*Nefropatía endémica de los Balcanes*", caracterizada por ser una grave afección histopatológica que cursa con una neuropatía túbulo-intersticial progresiva, derivando en atrofia tubular y fibrosis periglomerular, produciendo daños similares a los observados en animales. Los individuos en estado de malnutrición son especialmente sensibles a los efectos adversos de las micotoxinas (Ravelo *et al.*, 2011).

2.7.3 Toxicocinética

En 2006, la EFSA caracterizó la toxicocinética de la OTA como la de una toxina que se absorbe rápidamente después de la ingestión oral con una biodisponibilidad que oscila entre el 40% y el



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



66%, según la especie y la dosis. En la circulación sistémica, la OTA se une extensamente a la albúmina y otras proteínas séricas, lo que da lugar a largas vidas medias de eliminación en la sangre. En roedores, la ruta principal de excreción es a través de la bilis y las heces, mientras que la excreción renal prevalece en otras especies, incluidos monos y humanos (EFSA, 2006). La mayoría de las especies animales estudiadas presentan una primera y rápida absorción de la OTA en el estómago, facilitada por sus propiedades ácidas, seguida de una absorción intestinal lenta, cuando entre la sangre y la luz intestinal se da un gradiente de concentración favorable (López de Cerain, 2007). Se cree que la disponibilidad sistémica mediante difusión pasiva desde el estómago y específicamente desde el yeyuno proximal se facilita en gran medida por la alta afinidad de unión de OTA a proteínas plasmáticas. La absorción desde el yeyuno tiene lugar contra un gradiente de concentración y parece implicar un transporte para la OTA además, de la difusión pasiva (Studer *et al.*, 2000).

La biodisponibilidad de OTA tiene un valor promedio del 50%, 66% en cerdos, 56% en ratas y conejos y 40% en pollos en el estudio de Galtier *et al.* (1981) y depende principalmente de la especie, dosis, vehículo y presencia de alimentos en el estómago al momento de la administración de OTA (Studer *et al.*, 2000). Una característica importante de la OTA en los seres humanos y en muchas especies animales es su considerablemente alta unión no covalente a las proteínas séricas, en particular a la albúmina. La alta unión a las proteínas séricas facilita la absorción de la OTA, pero retrasa su eliminación de la sangre y su excreción y explica la larga vida media de la OTA en el cuerpo (Studer *et al.*, 2000).

La influencia de la fijación de la proteína plasmática de la OTA queda ilustrada por la observación de que la vida media de esta toxina en ratas con deficiencia de albúmina era mucho más corta que en ratas normales y que la concentración de OTA en la bilis y en la orina era de 20 a 70 veces mayor en los animales con deficiencia que en las ratas de control (Kumagai, 1985). La OTA interactúa con la albúmina como dianión, y se han identificado dos sitios de unión para la OTA en la albúmina sérica humana (Perry *et al.*, 2003). En el informe de Wu *et al.* (2011) se examina ampliamente el metabolismo de la OTA en diversas especies animales y los seres humanos. En la Figura 4 se presentan las vías de biotransformación establecidas en animales y los seres humanos.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

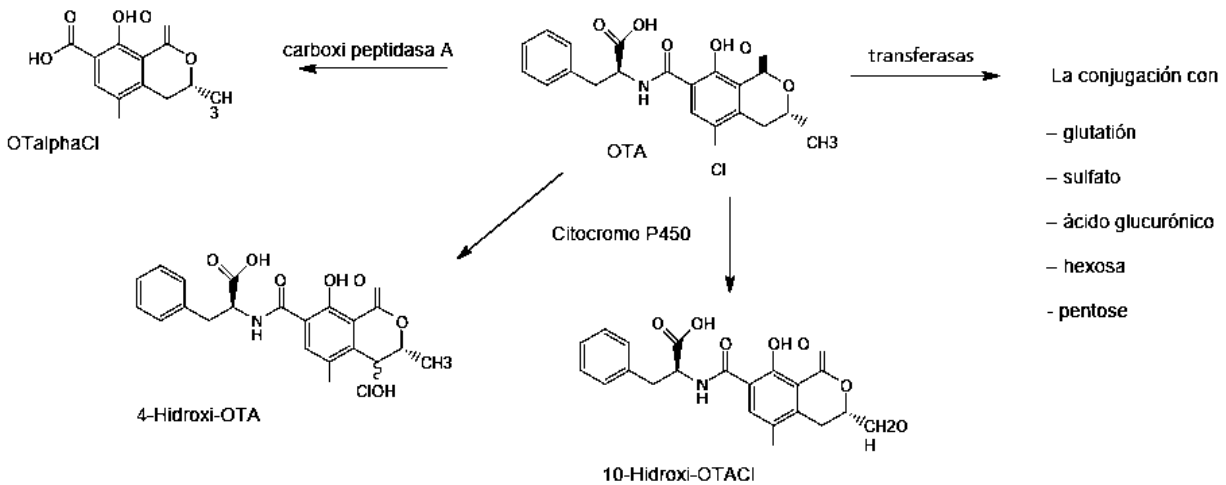


Figura 4. Vías metabólicas de la OTA en animales y humanos (Wu *et al.*, 2011)

Los principales metabolitos derivados de la OTA son el producto de su hidrólisis $OT\alpha$, los derivados hidroxilados 4-OH-OTA y 10-OH-OTA, y los productos de conjugación. De todos ellos, la $OT\alpha$ y 4-OH-OTA son los más significativos debido a que la población microbiana intestinal es capaz de metabolizar la OTA hasta $OT\alpha$ y fenilalanina principalmente por la actividad de la enzima carboxipeptidasa A; de igual manera, los principales metabolitos hepáticos parecen ser los epímeros (4R y 4S)-OH-OTA en cuya formación está implicado el sistema citocromo P450, una reacción metabólica común de fase I de muchos metabolitos lipófilos. Se ha demostrado que, en la formación de estos metabolitos, principalmente el epímero R y en menor medida el S, participan las isoformas de P450 1A1/1A2, 2B1 y 3A1/3A2 (Omar *et al.*, 1996). El otro metabolito hidroxilado mediado por el citocromo P450 es la 10-OH-OTA y solamente ha sido descrito *in vitro* después de la incubación de la OTA con microsomas de hígado de conejo (López de Cerain, 2007). La OTA puede ser sustrato de la enzima fenilalanina hidroxilasa, dando lugar a la Tyr-OTA, presente en el hígado de animales intoxicados. Este metabolito, a su vez, puede ser transformado hasta 4R/S-hidroxitirosin-ocratoxina A y otros metabolitos (Creppy *et al.*, 1990).

El principal metabolito de OTA es $OT\alpha$, que se forma cuando se hidroliza el enlace amídico entre la fenilalanina y el ácido dihidroisocumárico. Se encontró la $OT\alpha$ por primera vez en el ciego e intestino grueso de ratas y en las heces excretadas después de su administración oral. Se cree que este producto es generado principalmente por el microbioma intestinal en no rumiantes, incluidos



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



los humanos (Ali *et al.*, 2017) y por el microbioma ruminal en vacas, ovejas y otros rumiantes. Aunque algunos metabolitos hidroxilados y conjugados de la OTA se han descrito *in vitro* e *in vivo*, su biotransformación en general parece ser baja y se limita principalmente a la hidrólisis del enlace amida que conduce a OT α *in vivo*. Una característica observada en estudios *in vivo* con animales es la acumulación de OTA en los riñones, asociada a marcadas diferencias entre especies y sexos. Tanto los transportadores de aniones orgánicos (OTA 10) como los miembros de la familia de transportadores dependientes de ATP parecen estar involucrados en la absorción de OTA en las células renales (EFSA, 2006). La formación de OT α se considera una importante vía de detoxificación, aunque la toxina se absorbe parcialmente por el intestino. La OT α no se acumula en el riñón, pero es excretada rápidamente con la orina como glucurónido, siendo un importante metabolito urinario en los seres humanos (EFSA, 2020).

Además de estas rutas hidrolíticas y oxidativas bien establecidas de la OTA, se han propuesto otras vías de biotransformación de fase I y fase II. Estas incluyen: I) hidroxilación de OTA en el residuo de fenilalanina; II) apertura del anillo de lactona; III) decloración de OTA que conduce a OTB, una pareja redox de hidroquinona (OTHQ)/quinona (OTQ) y los conjugados de glutatión-S (GSH) correspondientes; y IV) la conjugación con una hexosa y pentosa, ácido glucurónico y sulfato (EFSA, 2020). La ocratoxina A es eliminada por heces y orina. En esta última, las concentraciones son máximas a las 6-8 horas después de la ingesta y descienden luego de 72 horas (Perusia & Rodríguez, 2001). El aclaramiento de la micotoxina por filtración renal está supeditado al valor de las respectivas constantes de unión con macromoléculas específicas, por lo que se favorece la eliminación por otras rutas en casi todas las especies (Hagelberg *et al.*, 1989). La vía urinaria parece predominar en humanos y primates no humanos, mientras que la excreción biliar y fecal parecen ser predominantes en ratas. Ambas rutas son lentas, debido a la alta unión de OTA a proteínas plasmáticas y la baja tasa de metabolismo (Dietrich, Heussner & O'Brien 2005). El metabolismo de la OTA en roedores, especialmente en ratas, ha sido ampliamente investigado. Sin embargo, la información en otras especies no es suficiente, especialmente en animales de compañía como los perros. Actualmente, no hay ningún informe sobre el metabolismo de la OTA en perros. (Meucci *et al.*, 2017).

La excreción renal de la OTA es de particular interés porque el riñón es el principal órgano objetivo de la toxicidad de esta toxina. Debido a su alta unión a proteínas plasmáticas, la OTA se



somete a secreción tubular en lugar de filtración glomerular, seguida de reabsorción en todos los segmentos de la nefrona (Ringot *et al.*, 2006). La reabsorción de la OTA secretada y filtrada no sólo lleva a su acumulación en el tejido renal, sino que también retrasa su excreción (EFSA, 2020). Se ha comprobado que los metabolitos OT α y OH-OTA desaparecen más rápidamente que su precursor. Así, en un estudio realizado con ratas, se puso de manifiesto que tanto la OTA como la OT α se eliminan principalmente por la orina, mientras que para la OH-OTA tiene lugar por la vía biliar (López de Cerain, 2007).

2.7.4 Toxicodinamia

El mecanismo toxicológico de ocratoxina A está mediado por la inhibición del factor nuclear eritroide-2 (Nrf2) y la transcripción del gen Nrf2, lo que genera estrés oxidativo y producción de especies reactivas de oxígeno, que inducen la inhibición en la síntesis de proteínas, interfieren con los sistemas metabólicos, promueven la peroxidación de lípidos de membrana, perturban la homeostasis del calcio, inhiben la respiración mitocondrial y provocan daño del DNA. Además, puede inducir a fallos en la apoptosis y a alteraciones en el gen P53. Estos mecanismos interaccionan potenciando su efecto incluso entre distintos tipos de ocratoxinas y sus metabolitos, como se observa en la Figura 5. Así, esta micotoxina es causante de nefrotoxicidad, teratogénesis y se comporta como un agente promotor del cáncer renal y hepático (Kamp *et al.*, 2005; Limonciel & Jennings, 2014; Martínez & Chávez, 2019).



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

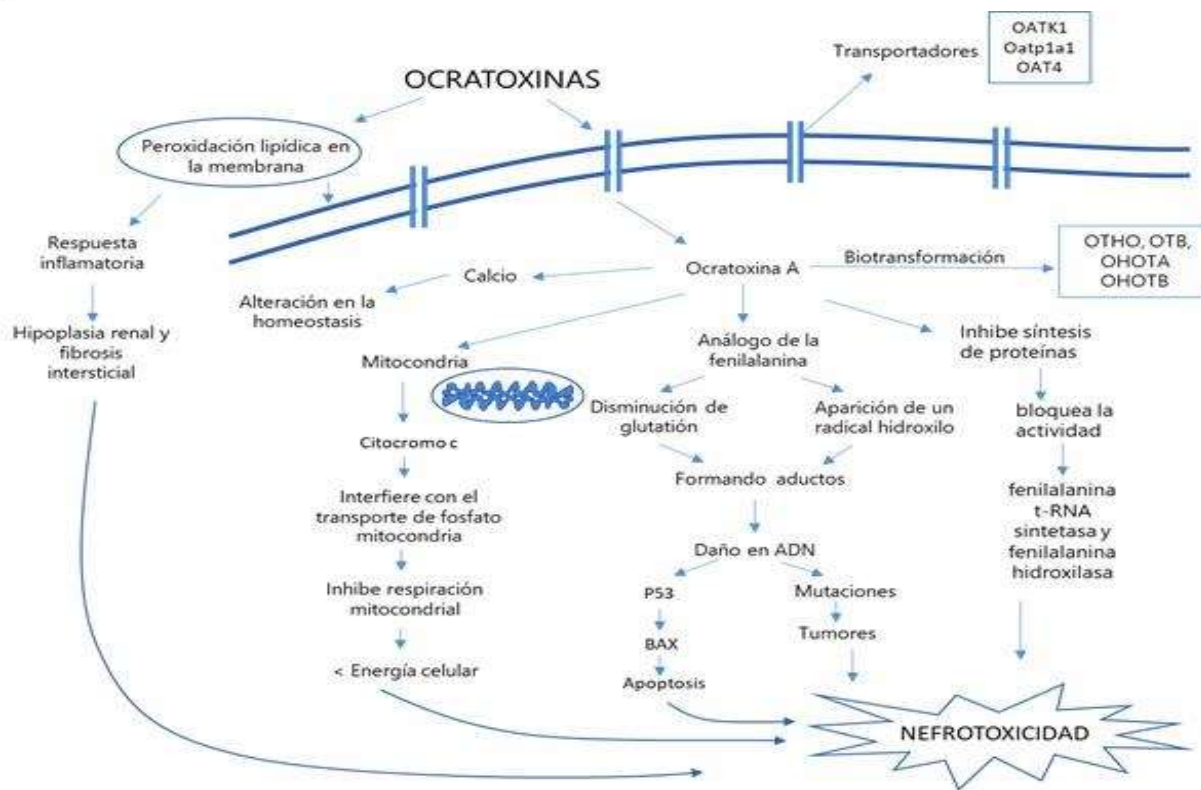


Figura 5. Modelo del mecanismo de nefrotoxicidad de las ocratoxinas inducido principalmente por la ocratoxina A (Martínez & Chávez, 2019)

La ocratoxina A es capaz de actuar mediante:

- Alteración de las actividades fundamentales de las mitocondrias, particularmente del tubo contorneado proximal del riñón, lo cual es capaz de desencadenar cambios ultraestructurales y fisiopatológicos, desembocando en nefropatías severas y mortales.
- Inhibición de la glucogenólisis hepática, lo cual acarrea acumulación de glucógeno.
- También a través de su acción sobre las mitocondrias del hepatocito.
- Inhibición de la respuesta inmune humoral y celular.
- Es teratogénica, mutagénica y posiblemente embriotóxica (Perusia & Rodríguez, 2001).

La OTA presenta un efecto inhibitorio sobre la síntesis proteica, actuando en la fase de traducción. Éste se puede ver en las células renales principalmente, mientras que en caso de las aflatoxinas se observa a nivel hepático. Así mismo, actúa sobre la enzima fosfoenol-piruvato-carboxiquinasa a nivel renal, degradando el mRNA codificado. De igual manera, la ocratoxina A



inhibe en forma competitiva a la fenil-alanil-tRNA sintetasa, impidiendo la formación de la fenil-alanil-tRNA, vital en la síntesis proteica a nivel celular (Perusia & Rodríguez, 2001). Sobre el metabolismo de los hidratos de carbono la ocratoxina A tiene:

- Efecto inhibitor en la formación de glucógeno hepático.
- Inhibición a nivel renal de la fosfoenol-piruvatocarboxicinas, produciendo una disminución de la gluconeogénesis (Perusia & Rodríguez, 2001).

También actúa en el estado III de la cadena respiratoria (fosforilación), mediante un mecanismo competitivo de la ocratoxina A por la captación del ácido dicarbónico, para el funcionamiento mitocondrial. Es bien sabido que la ocratoxina A es nefrotóxica y muy poco hepatotóxica, puesto que el riñón posee un mayor número de linfocitos que el hígado, siendo estos más sensibles a la micotoxina con relación a la inhibición de la síntesis proteica. Además, el hepatocito tiene la capacidad de metabolizar a la ocratoxina A, convirtiéndola en compuestos menos tóxicos (Perusia & Rodríguez, 2001).

2.8 Legislación

El Reglamento (CEE) N°315/93 del Consejo de la Comunidad Europea estipula que los alimentos que contengan un contaminante en una cantidad inaceptable para la salud pública no se comercializarán en el mercado, así como que los niveles de contaminantes deben ser mantenidos tan bajos como sea razonablemente posible y que, si es necesario, la Comisión Europea puede establecer niveles máximos para contaminantes específicos y puede incluir límites para los mismos contaminantes en diferentes alimentos, límites de detección analítica y referencia a los métodos de muestreo y análisis que deben usarse (EFSA, 2020).

En Europa hay una recomendación sobre niveles máximos en productos para alimentación de animales de compañía, Recomendación (UE) 2016/1319 de la Comisión de 29 de julio de 2016. De acuerdo con esto, es conveniente establecer un nivel orientativo para la ocratoxina A en los piensos para los perros a fin de proporcionar garantías zoonosanitarias en lo que respecta a dicha especie, prestando especial atención a que el empleo de una ración diaria de cereales y productos a base de cereales en piensos completos como alimento directo de los animales no suponga exponerlos a un nivel de micotoxinas superior a sus niveles de exposición correspondientes. Así



mismo, los términos “Cereales y productos a base de cereales” (Tabla 4) incluyen no sólo las materias primas para la alimentación animal, sino también otras materias primas derivadas de los cereales, en particular los forrajes y forrajes groseros de cereal (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria ELIKA, 2013; EFSA, 2020).

Más recientemente, a raíz de algunos dictámenes científicos emitidos por la EFSA, se han introducido "valores orientativos" específicos recomendados para el DON, la ZEA, la OTA, la toxina T-2 y HT-2, que también se refieren a los piensos compuestos destinados a perros o gatos (Grandi *et al.*, 2019).

Tabla 4. Niveles máximos en productos para alimentación animal (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria ELIKA, 2013; EFSA, 2020)

Producto	Límite (ppm)
Materias primas para piensos	
Cereales y productos a base de cereales	0.25
Piensos complementarios y completos	
Piensos compuestos para cerdos	0.05
Piensos compuestos para aves de corral	0.1
Piensos compuestos para gatos y perros	0.01

2.9 Determinación y cuantificación de OTA

Las medidas de control para garantizar la ausencia de micotoxinas en los alimentos, los piensos y el medio ambiente implican el análisis químico de estos contaminantes en una gran variedad de muestras, lo que se complica aún más por la diversidad estructural de las micotoxinas, que exige diferentes métodos analíticos (Cigic & Prosen, 2009).

Existen diferentes métodos analíticos que pueden ser utilizados para la cuantificación de las micotoxinas; debido a la baja concentración, del orden de ng/g en la que se encuentran, se requieren métodos analíticos más sensibles y además es necesario que el método se aplique a una variedad amplia de muestras (Krska & Molinelli, 2007). Normalmente, el análisis de micotoxinas es un



proceso multietapa que comprende la toma de muestra y su preparación, la extracción de la micotoxina de la matriz de la muestra y finalmente la detección y determinación cuantitativa (Koeppen *et al.*, 2010).

Para la determinación de la concentración de micotoxinas se utilizan diversos métodos analíticos cuantitativos basados en separaciones cromatográficas, entre ellas se encuentra la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta o fluorescente y la cromatografía en capa fina (TLC) que se usa para screening. Otro método analítico de gran interés son los ensayos inmunoquímicos, como el ELISA, o los sensores ópticos como la Resonancia de Plasmón Superficial (SPR), que permiten realizar análisis semicuantitativos y cuantitativos (Urusov *et al.*, 2010).

2.9.1 Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

Los métodos ELISA con detección espectrofotométrica son muy empleados en el análisis rutinario, pueden ser cualitativos, cuantitativos o semi-cuantitativos. La tecnología se basa en la capacidad de un anticuerpo específico de distinguir la estructura tridimensional de una micotoxina específica y llevar a cabo una etapa de reacción competitiva entre el antígeno y el anticuerpo durante un tiempo de 1-2 horas (Zheng *et al.*, 2006).

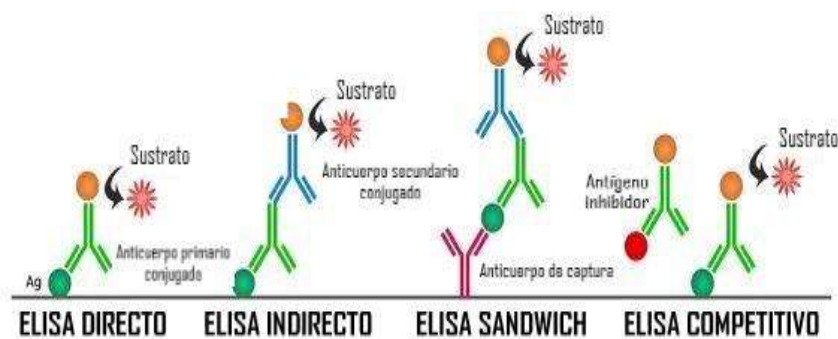


Figura 6. Diferentes esquemas de tipos de ELISA (Aryal, 2020)

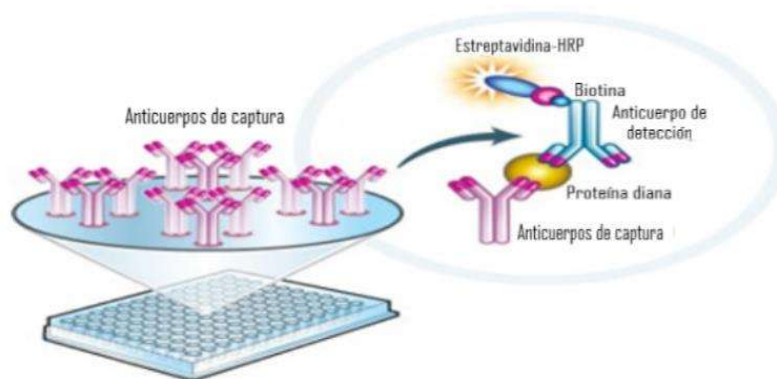


Figura 7. Principio de ELISA competitivo directo para el análisis de micotoxinas. Esquema de inmunoensayo en el pocillo ELISA (Cubel, 2013)

Existen numerosos métodos ELISA disponibles comercialmente para la determinación de micotoxinas basados en un ensayo competitivo (Figura 4 y 5) (Turner *et al.*, 2009). De acuerdo con el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente de España (2015), las ventajas que presentan el empleo de estos equipos son:

- Sensibilidad: la mayor parte de equipos dan resultados en el margen requerido según la legislación de la CE, o directrices nacionales o internacionales.
- Resultados rápidos: confirman la presencia o ausencia de toxina.
- Costo: no requieren de equipos caros.
- Personal: no requieren de personal entrenado.
- Materiales: no se emplean grandes cantidades de solventes, ni reactivos caros, ni es necesario cumplir ningún tipo de norma sobre el empleo de materiales tóxicos.

2.9.2 Evaluación de la exposición a OTA

Cuando se estudia la toxicidad de una micotoxina, es importante considerar el grado de exposición a la misma en la población, ya sea conociendo la exposición externa a través del nivel de contaminación de la micotoxina en los alimentos (ocurrencia) y qué cantidad de esos alimentos es ingerida diariamente o determinando la exposición interna a través de los niveles de concentración



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



de la micotoxina (biomarcador) en los líquidos biológicos (plasma, orina o en el caso de animales de experimentación también por el análisis de la micotoxina en diversos órganos) (Motta, 2009).

2.9.3 Estimación de la exposición externa a OTA

Cuando se estima la exposición externa, o sea la Ingesta Estimada Diaria (IED) de un contaminante, de acuerdo con lo planteado anteriormente, es necesario conocer la concentración del contaminante en los alimentos susceptibles y el nivel de consumo de esos alimentos. Este método de aproximación se llama “determinístico” o de “estimación de punto”. La IED total es obtenida realizando la suma de la ingesta del contaminante presente en todos los alimentos consumidos y se expresa como la cantidad del contaminante ingerido en un día. Esta unidad puede ser convertida en unidad de masa por kg de peso corporal por día usando un promedio de peso corporal (Motta, 2009).

2.9.4 Métodos para determinar la frecuencia de ingesta de alimentos

Para tener una estimación de la exposición a un contaminante es imprescindible conocer el consumo de aquellos alimentos que pueden estar contaminados. El método más apropiado para obtener los niveles de ingesta es un cuestionario o encuesta relacionado al consumo. Existen distintos tipos de encuestas. (Motta, 2009). Por ejemplo:

- Encuesta de frecuencia de ingesta.
- Recordatorio dietético de 24 horas.
- Registro dietético.

Los cuestionarios de frecuencia de ingesta y la historia dietética valoran el tipo y la cantidad de alimentos consumidos de manera semicuantitativa. Los métodos de frecuencia de ingesta constan de un cuestionario compuesto por una lista de alimentos, que se le presenta al encuestado y se le solicita que indique con qué frecuencia ingiere cada uno de ellos, utilizando términos fáciles de precisar, tales como veces por día, por semana o por mes. Los alimentos se eligen según los fines de estudio y no es indispensable valorar la ingesta total diaria (Motta, 2009).

Estas encuestas permiten la clasificación epidemiológica de los individuos según la frecuencia de ingesta de un determinado grupo de alimentos y los hábitos dietéticos que han



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



adquirido. Con el recordatorio dietético de 24 horas se le insta a recordar al encuestado el alimento que consumió durante algunos días, habitualmente el día anterior o las anteriores 24 horas al momento de la entrevista. El registro dietético es el término utilizado para los métodos en los que se anotan o registran los alimentos consumidos durante unos ciertos días generalmente entre 3 o 4 días (Motta, 2009).



3. JUSTIFICACIÓN

Existen varios factores que influyen en el incremento del número de animales de compañía en las grandes ciudades, uno de ellos es la demanda de mascotas para llenar espacios afectivos dentro de los entornos familiares y el desplazamiento de poblaciones rurales hacia las áreas urbanas, trayendo consigo la cultura de la posesión de animales. Por lo tanto, en los últimos años se ha observado un aumento en el consumo de alimentos comerciales para perros debido principalmente al estilo de vida de la población, lo cual ha llevado a que los propietarios se preocupen por ofrecer dietas balanceadas que aporten los nutrientes necesarios a sus mascotas, de acuerdo con su etapa fisiológica (Gómez *et al.*, 2007).

Se ha observado una mayor preocupación por evaluar los efectos en la salud pública del consumo de micotoxinas en algunos países de la Unión Europea, así como en Sudáfrica, Brasil, India y Estados Unidos, debido a diversos brotes de micotoxicosis en perros ocasionados por la ingesta de alimentos contaminados. Además, el riesgo potencial del consumo de micotoxinas en animales de compañía ha cobrado importancia debido al aumento de alimentos extruidos para mascotas, constituyendo una potencial amenaza para los animales de compañía, debido a su alto contenido en cereales.

Los perros son extremadamente sensibles a la ocratoxina A, ocasionando posiblemente enfermedad renal crónica; sin embargo, las dosis de OTA consideradas tóxicas o letales para perros no se han informado en la literatura clínica, por lo que es importante conocer si la OTA contribuye a dicha patología. Cortadellas & Fernández del Palacio (2012) mencionan que la enfermedad renal crónica es la patología renal más frecuente en el perro, con una prevalencia global del 1-3%, además de ser más frecuente en pacientes geriátricos (hasta el 10% de los perros de edades avanzadas pueden presentar ERC en diversos estadios), aunque puede afectar a perros de cualquier edad.

La determinación de ocratoxina A en alimentos para consumo animal se basa en métodos analíticos bien establecidos que determinan el grado de exposición a la toxina en pequeñas especies, ya que la ingesta durante tiempos prolongados ocasiona riesgos importantes a la salud de las mascotas, por lo tanto, será importante la determinación de OTA para poder tomar medidas preventivas que incidan en la protección de la salud de las mascotas.



4. HIPÓTESIS

Al menos el 50% del alimento comercial para caninos domésticos en México está contaminado por ocratoxina A, superando los niveles permisibles por las normas europeas, lo que contribuye a que los perros que lo consumen tengan cantidades significativas de OTA en sangre.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

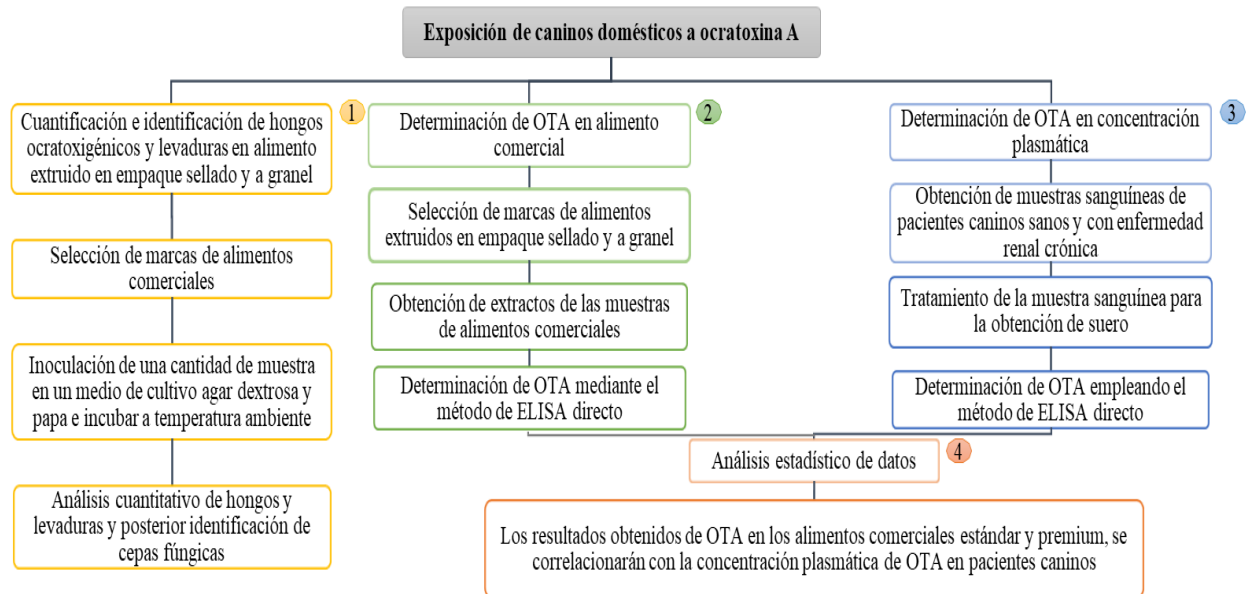
Determinar el grado de contaminación por ocratoxina A en alimentos comerciales para caninos domésticos y su correlación con su concentración plasmática.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el grado de contaminación por hongos ocratoxigénicos y levaduras viables presentes en alimentos extruidos para caninos en empaque sellado y a granel.
- Evaluar la concentración de OTA en alimentos extruidos comerciales de diferentes marcas en empaque sellado y a granel.
- Determinar la concentración plasmática de OTA en una muestra de perros que consumen dichos alimentos.
- Correlacionar la alimentación de los perros con las concentraciones plasmáticas de OTA encontradas.



6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Tipo y diseño de la investigación

Observacional, descriptivo, de corte transversal, prospectivo y analítico.

7.2 Muestra

Debido a que no existen datos de prevalencia de la contaminación en alimento para perros ni en muestras sanguíneas de los mismos, se usaron dos tipos de muestras: 25 muestras de diversas marcas de alimentos comerciales extruidos en empaque sellado y 25 muestras a granel, disponibles en establecimientos comerciales de la ciudad de Morelia, Michoacán; además, se usaron muestras sanguíneas a conveniencia de caninos domésticos que hayan sido alimentados con esos tipos de alimentos.

7.3 Población de estudio

Caninos domésticos sanos y con enfermedad renal crónica diagnosticada, que consumieran diferentes marcas de alimento comercial extruido para perros en el estado de Michoacán.

7.4 Criterios de selección

Inclusión:

- Pacientes caninos clínicamente sanos que cuenten con historia clínica actualizada, así como cuestionario de alimentación registrado.
- Pacientes caninos diagnosticados con enfermedad renal crónica, que posean cuestionario de alimentación registrado.
- Consentimiento informado firmado por los propietarios de las mascotas para la autorización de la toma de muestra sanguínea.

Exclusión:

- Pacientes en estado crítico y en hospitalización.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Pacientes caninos que no cuenten con pruebas de laboratorio clínico (hemograma, bioquímica y urianálisis).

Eliminación:

- Muestras sanguíneas de pacientes caninos sin antecedentes clínicos, dietéticos o muestras no identificadas.
- Muestras sanguíneas hemolizadas.

7.5 Consideraciones éticas

El presente estudio se cataloga como de riesgo mínimo, ya que no supone peligro alguno para la integridad de los pacientes caninos a muestrear, cumplió con las Normas Oficiales Mexicanas NOM-062-ZOO-1999 sobre Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la NOM-012-ZOO-1993 acerca de las Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos.

El proyecto contó con una Carta de Consentimiento Informado (*ver anexo 13.1*) para la autorización de los propietarios previo a proceder a la toma de muestra sanguínea y la aplicación de instrumentos de medición.

7.6 Variables

VARIABLES BIOQUÍMICAS.

- Concentración de OTA en alimentos comerciales de distintas marcas (variable dependiente cuantitativa en ng/g).
- Concentración plasmática de OTA en pacientes caninos (variable dependiente cuantitativa en ng/mL).

VARIABLES MÉDICAS.

- Cuestionario sobre la historia clínica del paciente (variable independiente, cualitativa y cuantitativa).



Variables dietéticas.

- Cuestionario sobre nutrición y alimentación de caninos domésticos (variable independiente, cuantitativa y cualitativa).

7.7 Instrumentos de medición

- *Cuestionario de la historia clínica del paciente (Ver anexo 13.2).*

Dentro de este formulario se recaudó información de los siguientes aspectos:

- 1) Reseña del paciente: incluye datos generales (identificación, especie, raza, sexo, edad), datos administrativos (número de historia clínica) y los datos personales de los propietarios (nombre y apellido, dirección actual y teléfono).
 - 2) Anamnesis: se incluyen datos correspondientes a los antecedentes clínicos de la mascota (heredo-familiares, medicina preventiva, alimentación, convivencia con otros animales, lugar donde vive, actividad física, comportamiento reproductivo, antecedentes de enfermedad y quirúrgicos), así como datos clínicos actuales (motivo de la consulta, signos clínicos).
 - 3) Examen físico: agrupa los parámetros que nos orienten sobre el estado fisiológico que presenta el animal en ese momento (inspección general y principales hallazgos encontrados en la exploración física del paciente).
 - 4) Diagnóstico: presuntivo, diferencial y definitivo.
 - 5) Pruebas complementarias y pronóstico.
 - 6) Esquema terapéutico: Tratamiento, evolución y profilaxis.
- *Cuestionario de nutrición y alimentación de caninos domésticos (ver anexo 13.3)*
- 1) Tipo de alimentación: dieta a base de alimento concentrado, comida casera o ambos y el tiempo de ingesta de dicha dieta.
 - 2) Frecuencia del consumo de la dieta: *ad libitum* o raciones al día.
 - 3) Marca del alimento proporcionado.



7.8 Procedimiento metodológico

- *Etapas de muestreo*

Esta etapa duró un lapso de tiempo de 6 meses, desde noviembre de 2020 a mayo de 2021 para muestras de alimento y desde febrero de 2021 a diciembre de 2021 para la colecta de muestras sanguíneas. Se seleccionaron 25 distintas marcas comerciales de alimentos extruidos en empaque sellado y 25 muestras a granel, de distintos puntos de venta en Michoacán. Los empaques seleccionados fueron transportados al Laboratorio de Desarrollo Analítico de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH).

Se acudió a diversas clínicas, hospitales y laboratorios clínicos veterinarios de Morelia para solicitar la autorización para la toma de muestra sanguínea mediante la Carta de Consentimiento Informado, con la finalidad de obtener muestras de pacientes caninos sanos que consumían diferentes marcas comerciales de alimentos extruidos y pacientes caninos con enfermedad renal crónica diagnosticada. Una vez firmada la Carta de Consentimiento Informado, se procedió con el cuestionario de la historia clínica del paciente y el cuestionario sobre nutrición y alimentación de caninos domésticos.

Posteriormente, se realizó la tricotomía y antisepsia de la zona de venopunción en el canino para la toma de muestra sanguínea mediante la punción de la vena cefálica, yugular o safena, extrayendo 2.5 mL de sangre venosa con material nuevo estéril descartable. La muestra fue reservada en tubos BD Vacutainer® para separar suero. Los tubos con la muestra sanguínea se almacenaron en una hielera con gel refrigerante para mantenerlas a una temperatura adecuada y posteriormente fueron transportadas al Laboratorio de Desarrollo Analítico de la UMSNH en un plazo no mayor a 4 horas.

- *Tratamiento de la muestra de alimento comercial*

Esta etapa se llevó a cabo en el Laboratorio de Desarrollo Analítico de la UMSNH, donde fueron abiertos los empaques de alimentos seleccionados para posteriormente mezclarse individualmente y obtener una muestra representativa de 500 g, la cual fue recolectada de 5 sitios diferentes (4 de los extremos y uno del centro), considerando que la distribución de las micotoxinas en el alimento se encuentra dispersa de manera heterogénea. Todas las muestras representativas se colocaron y



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



sellaron en un empaque nuevo, así mismo, fueron identificadas con el nombre de la marca comercial, el número de serie, lote y lugar de adquisición.

Las muestras representativas (500 g de alimento comercial para perros granulado) fueron mezcladas nuevamente y se pesaron 200 g de cada muestra, posteriormente se sometieron a un proceso de homogeneización (trituration) hasta obtener partículas finas usando un mortero de porcelana.

Se realizó un análisis de la formulación de cada una de las muestras a evaluar y se determinó su pH empleando un potenciómetro de marca Hanna ®, con la finalidad de clasificar al alimento extruido dentro de la NOM-130-SSA1-1995 sobre “Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias”.

- *Cuantificación de hongos y levaduras en el alimento comercial extruido.*

Se pesó 1 g de cada muestra para ser vertida de manera directa en ambas condiciones de placas con PDA y se elaboró una suspensión primaria de cada una de las muestras a partir de 1 g de croquetas molidas disueltas en 100 mL de agua destilada estéril. Se tomó 1 mL de la suspensión primaria de cada muestra y se sembró uniformemente por extensión en superficie empleando un asa Drigalsky en medio de cultivo PDA sin antibiótico y en medio suplementado con cloranfenicol a una concentración de 50 mg/L.

Posteriormente, las muestras directas de croqueta molida y en suspensión fueron inoculadas al triplicado para después incubarse a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 5 a 7 días. Las placas fueron evaluadas visualmente en búsqueda de la formación de colonias para su cuantificación, tomando en cuenta aspectos como la textura de la superficie, la consistencia del medio, coloración del anverso y reverso de la placa, gotas de exudado, etc.

- *Aislamiento e identificación morfológica de hongos ocratoxigenicos en el alimento extruido.*

Las colonias fúngicas cuantificadas fueron aisladas individualmente. Para ello, se tomó el micelio de colonias bien delimitadas para su resiembra en placas con medio de cultivo PDA suplementado



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



con cloranfenicol a una concentración de 50 mg/L, con la finalidad de obtener cultivos axenicos de distintas especies. Los hongos aislados fueron almacenados a una temperatura de 28 ± 2 °C durante 7 días para su posterior identificación morfológica en base a las características macro y microscópicas. Para esto, se realizaron preparaciones empleando tinciones con azul de lactofenol de la siguiente manera:

- Se adhirió una tira de cinta adhesiva transparente sobre una porción del micelio aéreo de la colonia fúngica.
- Se colocó una gota de azul de lactofenol sobre el portaobjetos.
- Se adhirió la cinta adhesiva con el micelio sobre el colorante de azul de lactofenol en el portaobjetos sin formar burbujas de aire.
- Se observó la impronta del hongo al microscopio.

- *Extracción de OTA en alimento comercial*

El producto de molienda obtenido de cada una de las muestras de croquetas se tamizó empleando un tamiz de malla #20. Se tomaron 20 g del tamizado y se le agregaron 100 mL de metanol al 70% agitando durante 5 minutos. Se recuperaron 10 mL de sobrenadante y se centrifugó a 1008 G durante 10 minutos. Finalmente, se tomó una alícuota de 1.5 mL en un micro tubo de centrifuga, la cual se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta la cuantificación.

- *Determinación de OTA en alimento comercial*

Una vez obtenidos los extractos de las muestras, se procedió con la aplicación del método de inmunoensayo enzimático (ELISA) competitivo directo mediante el protocolo del kit comercial de marca Helica ®. Se utilizó el kit comercial: Ochrotoxin A Universal Detection ELISA Kit, 96-wellkit (Helica Biosystems, Inc., Santa Ana, CA) de número de lote 102920, conservado a una temperatura de refrigeración de 2- 4 °C hasta su empleo. El procedimiento se llevó a cabo mediante las indicaciones del fabricante descritas a continuación:

- Los reactivos se mantuvieron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de usarse.
- Se reconstituyó el paquete PBS-Tween agregando el contenido en polvo a un litro de agua destilada en un matraz volumétrico.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Se colocó en cada pocillo de mezclado 200 μL del conjugado incluido en el kit.
- Se adicionó 100 μL de cada estándar y muestra preparada al pozo de mezcla que contiene el conjugado. Se mezcló pipeteando al menos 3 veces.
- Se transfirieron 100 μL de cada pocillo de mezclado a su correspondiente pocillo de la placa sensibilizada con anticuerpos para OTA y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se removió el líquido de los pocillos y se lavaron 5 veces con 200 μL de solución de lavado PBS-Tween.
- Se agregaron 100 μL de conjugado enzimático a cada pocillo. Se mezclaron e incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se removió el líquido de los pocillos y se lavó 5 veces con solución de lavado PBS-Tween.
- Se golpearon los micropocillos (boca abajo) sobre toallas absorbentes para eliminar el tampón de lavado residual.
- Se agregaron 100 μL de reactivo de sustrato cromógeno a cada micropocillo, se mezclaron e incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Se agregaron 100 μL de solución de paro, en la misma secuencia que se siguió con el reactivo anterior.
- Se midió la densidad óptica (DO) en unidades de absorbancia de cada pocillo utilizando un filtro de 450 nm en un espectrofotómetro UV/Vis instrumentation Thermo Fisher Scientific®.
- Se calcularon las concentraciones de OTA en ng/g se obtuvieron mediante una curva de calibración a partir de las concentraciones de soluciones estándar y la interpolación de datos de absorbancia.

Para la interpretación de los resultados, las muestras de alimentos extruidos se habían diluido en una proporción de 5:1 con metanol al 70% para el procedimiento de extracción, por lo que la concentración de ocratoxina A que muestra el estándar fue multiplicado por 5 para indicar los ng por gramo (ppb) de la muestra, como se indica en la Tabla 5:



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



Tabla 5. Valores estandares de OTA en viales y en materia prima del kit comercial de Helica ® (Ochratoxin A Universal Detection ELISA)

Estándar (ng/g)	Muestra materia prima (ppb):
	1:5
0.0	0.0
0.05	0.25
0.1	0.5
0.2	1
0.4	2
0.8	4

- *Tratamiento de la muestra sanguínea*

Se separó el suero de las muestras sanguíneas por medio de centrifugación a 1008 G durante 10 minutos a temperatura ambiente, para obtener alrededor de 1 mL de suero, el cual se separa en dos alícuotas de 500 μ L que se colocan en micro tubos etiquetados con fecha y número de registro de cada paciente, asimismo, se almacenaron en un ultracongelador hasta su análisis por medio de ELISA.

- *Extracción de OTA en la muestra sanguínea.*

Para la preparación de la muestra, se obtuvieron 300 μ L de una de las alícuotas de 500 μ L de suero, a la cual se le adicionó 300 μ L de metanol absoluto como disolvente, se mezcló vigorosamente empleando un vórtex y llevando las muestras a la centrífuga a 1008 G durante 10 minutos. El sobrenadante fue retirado y almacenado a una temperatura de 4 °C para su posterior análisis.

- *Determinación de OTA en la muestra sanguínea.*

Se realizó la determinación de OTA empleando el método de ELISA directo, de acuerdo a las recomendaciones del kit comercial Helica ® descritas anteriormente, para cuantificar mediante una curva de calibración la concentración en suero de micotoxinas en ng/mL. Para la interpretación de los resultados, las muestras sanguíneas se habían diluido en una proporción de 1:2 con metanol en



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



el procedimiento de extracción, por lo que el nivel de ocratoxina A que muestra el estándar fue multiplicado por 2 para indicar los ng por litro (ppb) de la muestra de suero sanguíneo de la siguiente manera (Tabla 6):

Tabla 6. Valores estadares de OTA en viales y en muestra de suero del kit comercial de Helica® (Ochratoxin A Universal Detection ELISA)

Estándar (ng/mL)	Muestra suero (ppb): 1:2
0.0	0.0
0.05	0.1
0.1	0.2
0.2	0.4
0.4	0.8
0.8	1.6

7.9 Análisis de datos

Se aplicaron análisis estadísticos empleando medidas de tendencia central, de dispersión y pruebas estadísticas paramétricas como la de “t” de student para examinar diferencias entre las muestras independientes y análisis de varianza “ANOVA” para determinar diferencias entre los grupos en que se encuentran clasificadas las muestras de alimento evaluadas. Los resultados obtenidos de OTA en los alimentos comerciales se correlacionaron con la concentración plasmática de OTA en pacientes caninos mediante una prueba de correlación de Spearman con un nivel de confianza del 94%.



8. RESULTADOS

8.1 Características del alimento extruido

Con base en la clasificación de la PROFECO (Figura 8), el 20% de las muestras de alimento extruido analizadas se catalogan en “Tipo AB” debido a que cumplen con los requerimientos nutricionales indispensables del perro adulto y satisfacen su apetito. El 16%, se clasifican como “Tipo AE”, ya que además de cumplir con los requerimientos indispensables, incluye en su formulación vitaminas, minerales, e ingredientes que mejoran la digestibilidad, asimismo promueve la aceptación del producto en el canino adulto. El 8% son catalogadas como “Tipo AP” dado a que cumplen con los requerimientos mínimos de nutrición y poseen una mayor calidad en sus ingredientes. El otro 8% pertenece a “Tipo AS”, al ser alimentos especializados cumplen con los requerimientos nutricionales de cada raza, considerándose el alimento extruido de mayor aceptación y de mejor rendimiento por porción. El 48% de las muestras “No aplican” dentro de la clasificación, ya que estos grupos fueron definidos en base a un estudio elaborado por la PROFECO.

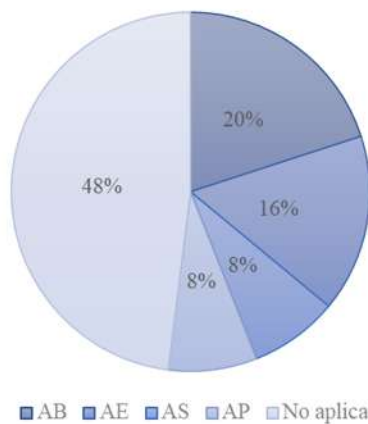


Figura 9. Clasificación de alimento seco para perro en base a la PROFECO

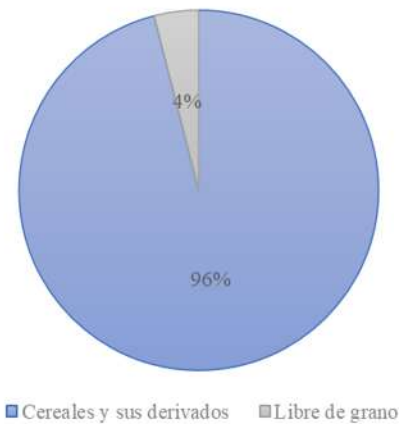


Figura 8. Porcentaje de muestras de alimento extruido formuladas a base de cereales



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

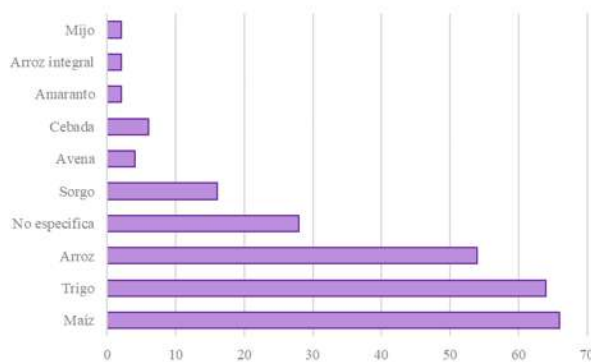


Figura 11. Porcentaje de cereales empleados en la formulación de alimentos extruidos de acuerdo con el empaquetado

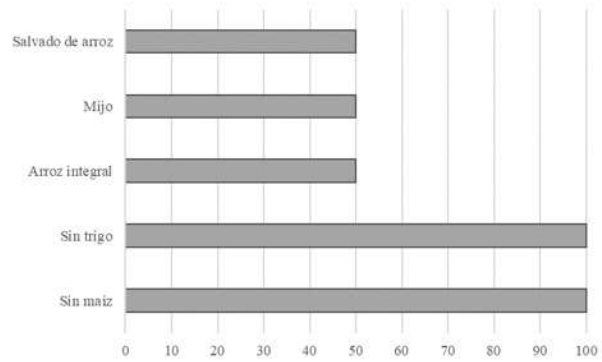


Figura 10. Porcentaje de cereales menores empleados para la elaboración de alimentos extruidos libres de grano

Con respecto a la formulación de las muestras de croquetas evaluadas, corresponde a una formulación basada en una gran cantidad de cereales y sus derivados, en cambio el 4% de la totalidad de las muestras (n=50) aseguran poseer ingredientes libres de granos para su formulación (Figura 9). Del 96% de las muestras elaboradas con cereales y sus derivados, se logró determinar que el 66% poseen maíz (*Zea mays*), seguido de trigo (*Triticum*) con el 64% y arroz (*Oryza sativa*) con el 54% de acuerdo con el empaquetado de los alimentos muestreados (Figura 10). Asimismo, se determinó que los cereales mayores son sustituidos por otros cereales menores en las muestras que aseguran ser libres de granos, tal es el caso del salvado de arroz, mijo (*Panicum miliaceum*) y arroz integral (Figura 11), además de incluir papa y pulpa de betabel dentro de su formulación.

El 28% de las marcas muestreadas de croquetas en empaque sellado (Figura 12) aseguran estar suplementados con probióticos utilizando principalmente a la levadura seca activa por su potencial efecto probiótico y el 32% enriquecidas con prebióticos dentro de su formulación.

Se evaluó el tipo de conservadores empleados en las croquetas muestreadas (Figura 13), determinando que el propionato de calcio se encuentra en mayor frecuencia: en cambio, la mayoría de los empaques no especifican la clase de conservador que añaden dentro de su formulación.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

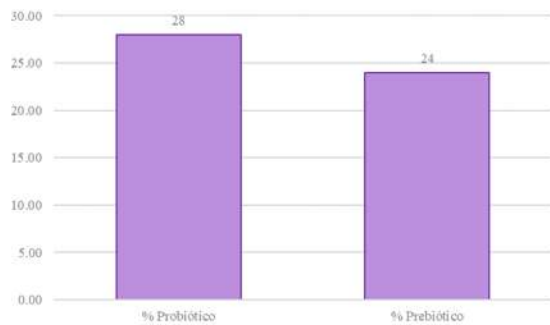


Figura 12. Muestras de alimentos extruidos enriquecidos con probióticos y prebióticos

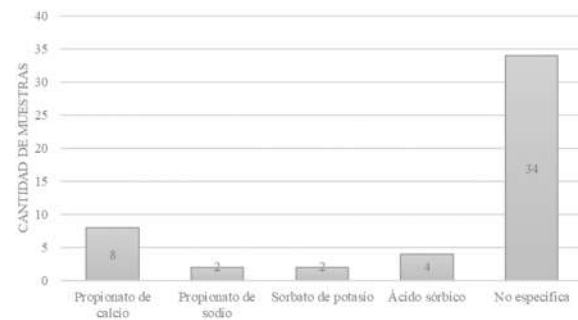


Figura 13. Frecuencia de conservadores reportados en las muestras de alimentos extruido

De igual manera, se establecieron los aditivos antioxidantes mayormente empleados en la fabricación de las croquetas comerciales (Figura 14) de acuerdo a la etiqueta del empaque, encontrando una mayor presencia de butilhidroxianisol (BHA) y el butilhidroxitolueno (BHT), seguido del ácido ascórbico, ayudando a la conservación de los alimentos comerciales, retardando el deterioro, la rancidez, el sabor y la decoloración de las croquetas resultante de los procesos oxidativos.

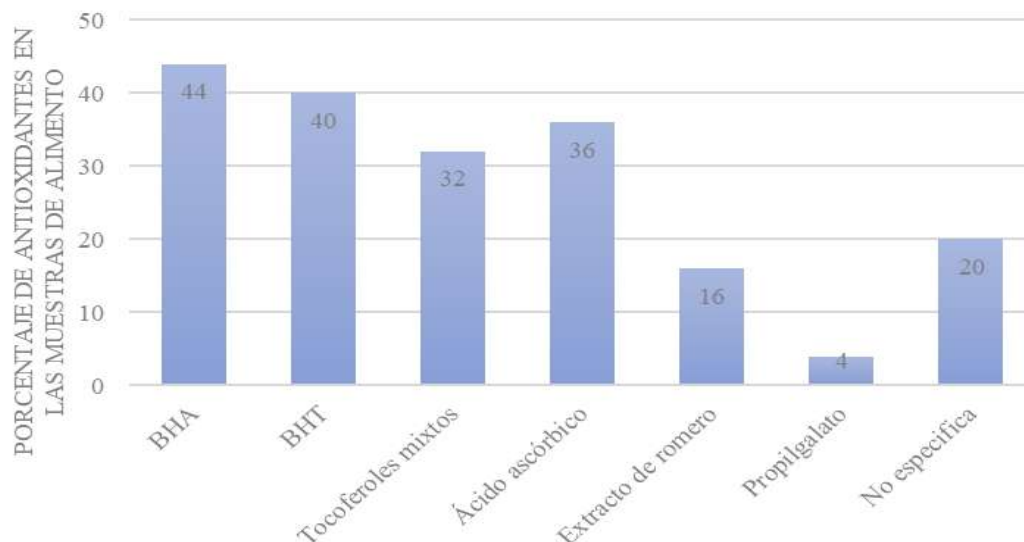


Figura 14. Porcentaje de antioxidantes reportados en las muestras de alimento extruido



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



Se obtuvo como resultado que las muestras de empaque sellado (Tabla 7) ES13, ES14 y ES15 tuvieron un pH mayor de 6.0 pero menor de 7.0 (Figura 15), en cambio las muestras ES21 y ES22 presentan los valores menores con un pH de cercano a 5.0. En lo que respecta a las muestras a granel (Tabla 8), se puede observar que la gran mayoría de las muestras presenta valores de pH cercanos o mayores a 6.0 pero menor a 7.0 y únicamente la muestra EG16 se encuentra mas cercana a un pH de 5.0 (Figura 16). A pesar de ello, no hay una relación entre el pH de las distintas muestras evaluadas, ya que las marcas de croquetas se encuentran en diferente categoría. Debido a que actualmente no existe una normativa específica en alimentos para mascotas en nuestro país, se analizaron estos resultados con el propósito de catalogarlos en alguna normativa que considere características similares a las de alimentos extruidos para perros.

Tabla 7. Marcas de muestras de alimento extruido para perros en empaque sellado

ES 01	Perron	ES 06	Purina Dog Chow	ES 11	Natdog	ES 16	Forty Dog	ES 21	Beneful Purina
ES 02	Royal Canin	ES 07	Petline	ES 12	Winners	ES 17	Dog Star	ES 22	Pro Plan Purina
ES 03	Exceed	ES 08	Sportsman’s Choice	ES 13	Top Choice	ES 18	Pedigree	ES 23	Diamond
ES 04	Can Pro	ES 09	Chedrahui	ES 14	Whole Hearted	ES 19	Nupec	ES 24	Campeón Purina
ES 05	Nufit	ES 10	Ganador	ES 15	Canidae Pure	ES 20	Perfect Sense	ES 25	Ol’ Roy

Tabla 8. Marcas de muestras de alimento extruido para perros a granel

EG 01	Perron	EG 06	Top Choice	EG 11	Campeón	EG 16	Beneful	EG 21	Champ Res
EG 02	Nucan	EG 07	Shaggy	EG 12	Royal Canin	EG 17	Actican	EG 22	Grateful
EG 03	Poder Canino	EG 08	Óptimo Canino	EG 13	Nupec	EG 18	Nogacan	EG 23	Maxi Bobby
EG 04	Purina Dog Chow	EG 09	Pedigree	EG 14	Purina Pro Plan	EG 19	Pal perro	EG 24	Hi Multi Pro
EG 05	Ganador Premium	EG 10	Silver Can	EG 15	Diamond	EG 20	Petline	EG 25	Hi Dog



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

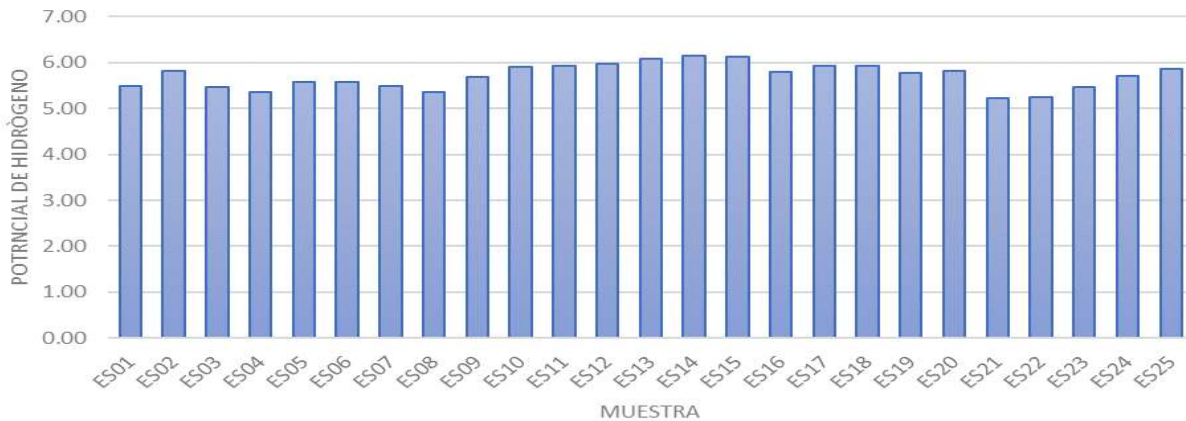


Figura 15. Variaciones de pH en muestras de alimento extruido en empaque sellado

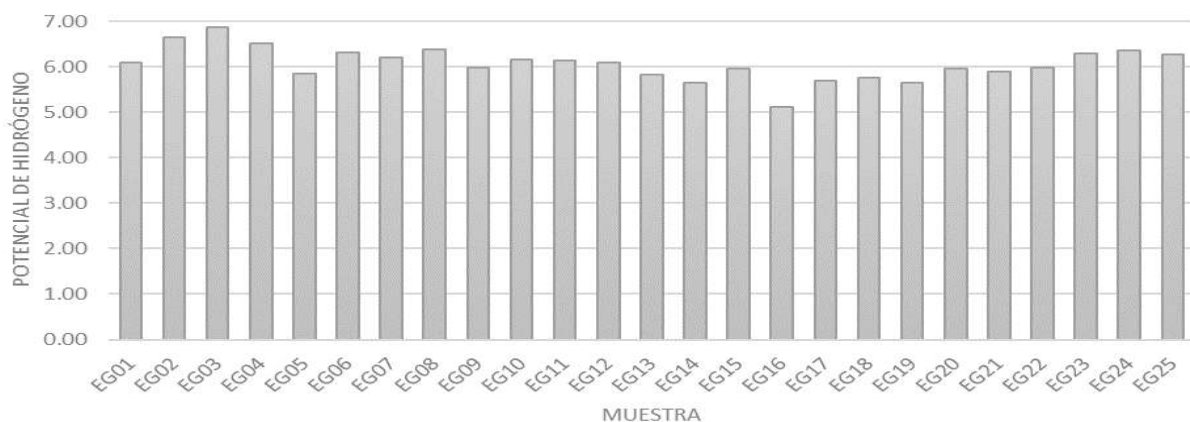


Figura 16. Variaciones de pH en muestras de alimento extruido a granel

8.2 Recuento de hongos y levaduras en alimento comercial de empaque sellado y a granel

A una concentración de 1 g de muestra en siembra directa sin antibiótico se puede observar la aparición de colonias fúngicas, en donde únicamente el 8% de las muestras en empaque sellado (ES08 y ES13) (Figura 17) son negativas a la presencia de microorganismos fúngicos. En lo que respecta a las muestras a granel (Figura 18), se logra observar una contaminación del 100% de las muestras, en donde el 8% de las muestras (EG14 y EG25) superan a las 5.0×10 UFC/g.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

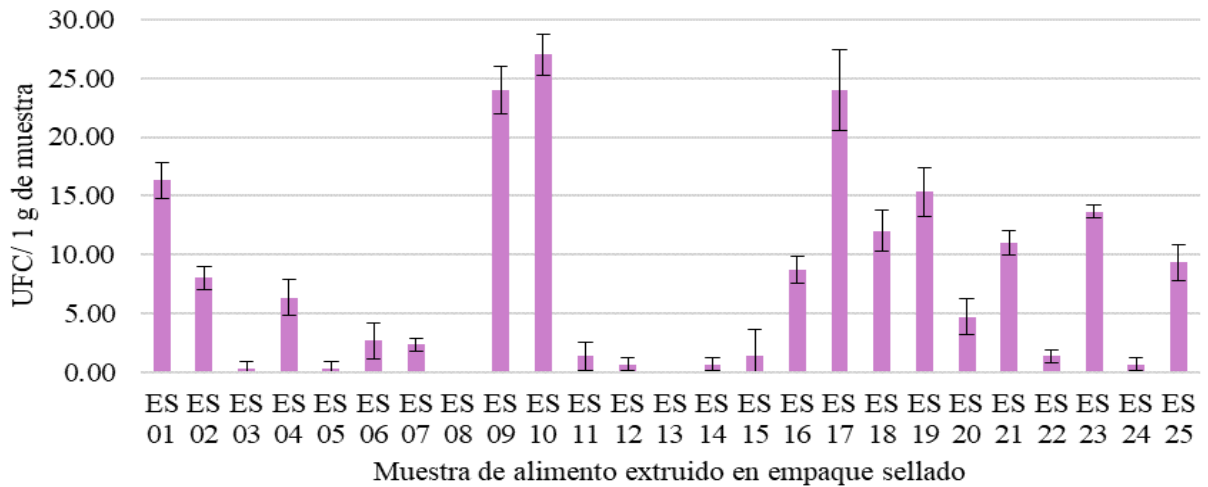


Figura 17. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra sin antibiótico de muestra directa de alimento extruido en empaque sellado

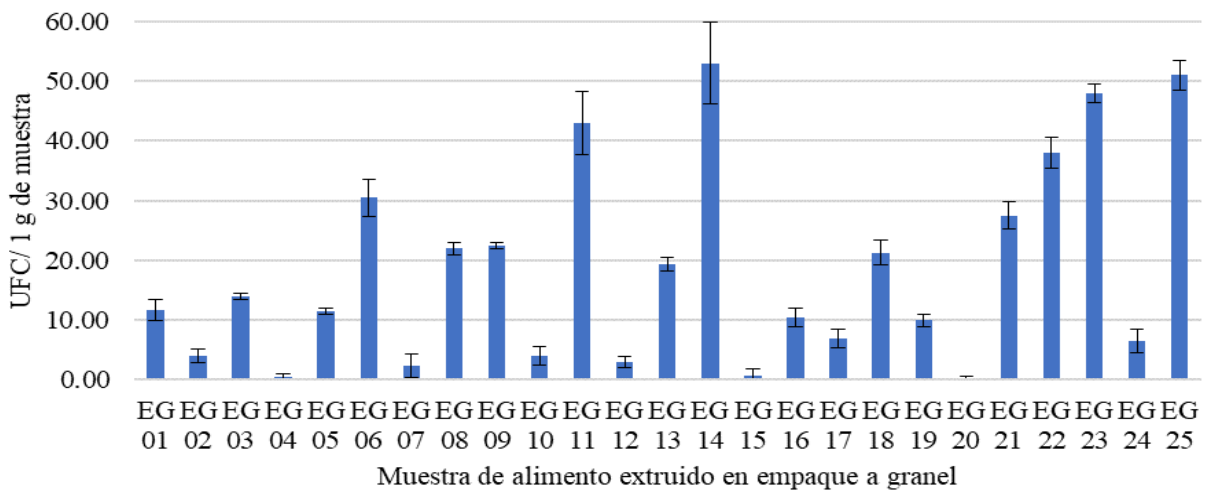


Figura 18. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra sin antibiótico de muestra directa de alimento extruido a granel

De igual manera, se evaluó el desarrollo macroscópico de colonias de hongos filamentosos en las placas sin antibiótico de muestras de alimento extruido en empaque sellado y a granel (Figura 20 y 21), observándose una abundante presencia de levaduras y bacterias en las muestras analizadas.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

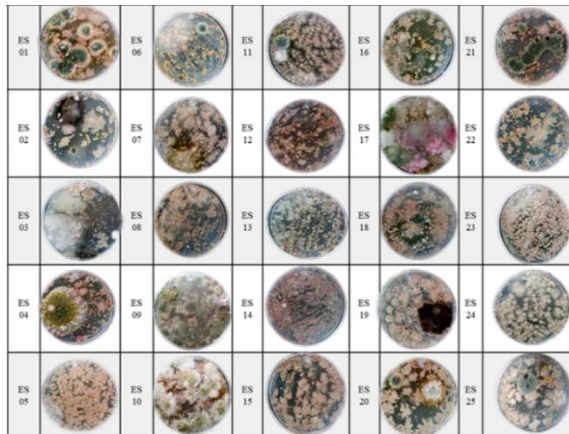


Figura 19. Desarrollo macroscópico de colonias de hongos filamentosos en muestras directas de empaque sellado en PDA sin antibiótico

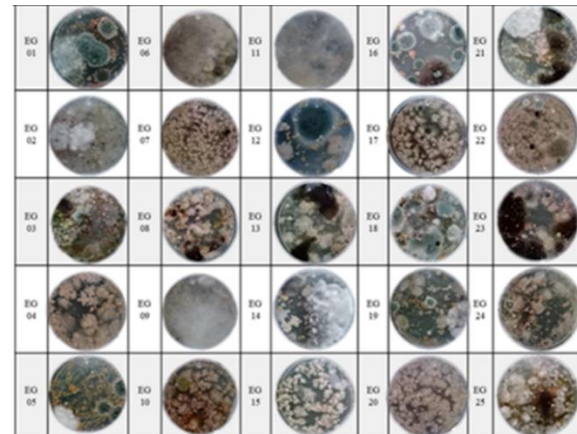


Figura 20. Desarrollo macroscópico de colonias de hongos filamentosos en muestras directas a granel en PDA sin antibiótico

A concentración de 1 g de muestra directa en placas PDA suplementado con antibiótico, se encontró la presencia poco frecuente de especies fúngicas en la mayoría de las muestras evaluadas de empaque sellado, observando que el 72% de las muestras son positivas y solamente el 28% de las muestras evaluadas son negativas a la presencia de colonias fúngicas (ES02, ES06, ES08, ES14, ES15, ES16 y ES24) (Figura 21). Dentro de las muestras a granel el 12% es superior a las 1.0×10 UFC/g. Como era de esperarse, las UFC de hongos filamentosos presentes en alimentos extruidos para mascotas a granel se presentaron con mayor frecuencia y crecimiento con respecto a las muestras de empaque sellado, observándose que únicamente una muestra es negativa a la contaminación fúngica (EG19) (Figura 22); sin embargo, no se garantiza que se hayan degradado o inactivado a las toxinas producidas por los hongos toxigénicos por los procesos industriales empleados para la elaboración de alimentos concentrados para mascotas.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

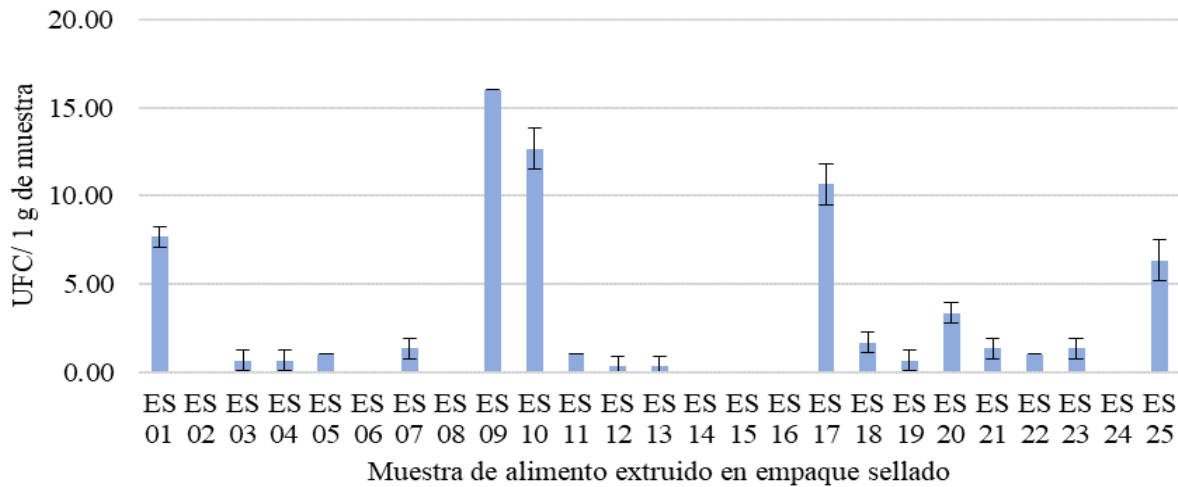


Figura 21. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra con antibiótico de muestra directa de alimento extruido en empaque sellado

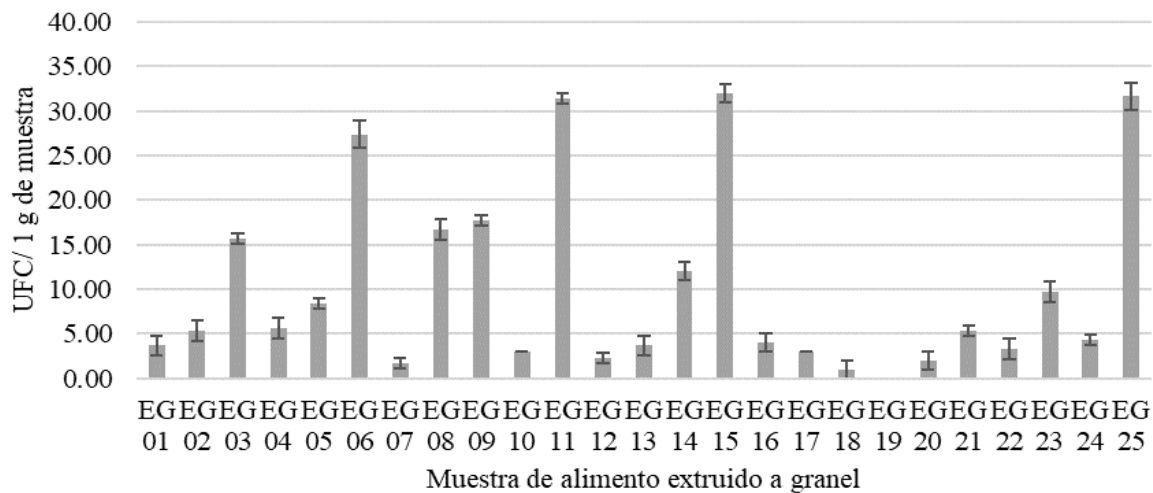


Figura 22. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra con antibiótico de muestra directa de alimento extruido a granel

En lo que respecta a la suspensión primaria sin antibiótico, se puede observar que el 100% de las muestras en empaque sellado y a granel son positivas a la presencia de hongos filamentosos (Figura 23 y 24). La totalidad de las muestras evaluadas en empaque sellado se mantienen por debajo de 1.0×10 UFC/g; sin embargo, el 16% de las muestras a granel supera esta cifra. En el desarrollo macroscópico se puede observar la presencia de hongos filamentosos en menor cantidad con respecto a las muestras directas (Figura 25 y 26).



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

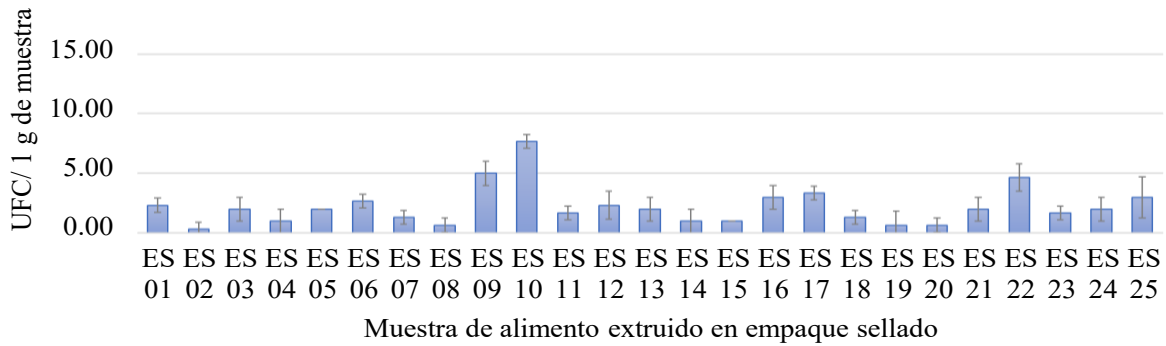


Figura 23. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra sin antibiótico de suspensión primaria de alimento extruido en empaque sellado

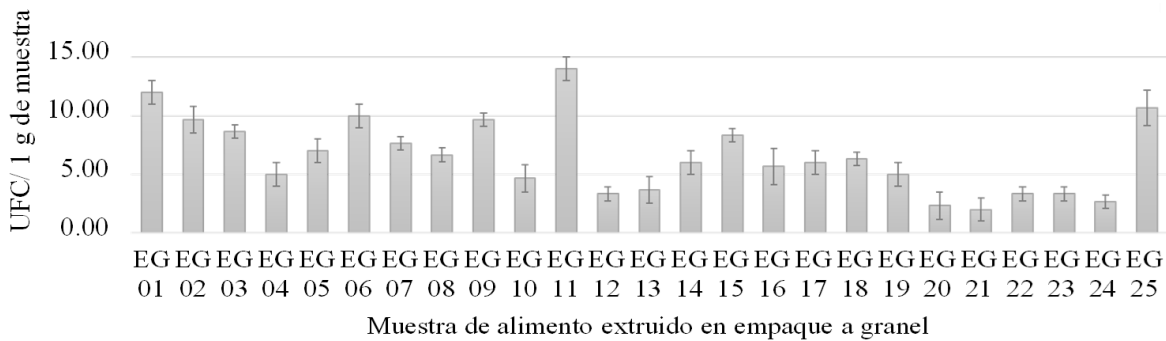


Figura 24. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra sin antibiótico de suspensión primaria de alimento extruido a granel

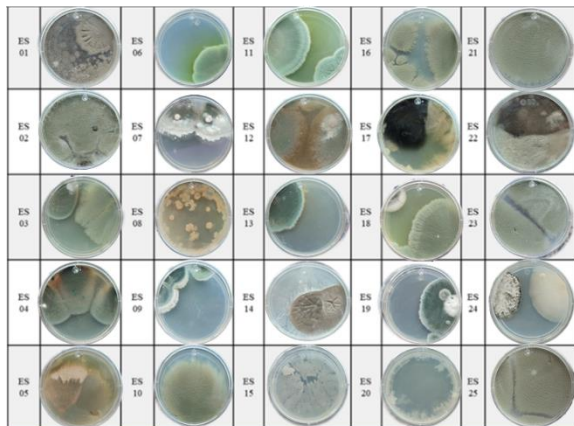


Figura 25. Desarrollo macroscópico de colonias de hongos filamentosos en suspensión primaria de muestras de empaque sellado en PDA sin antibiótico

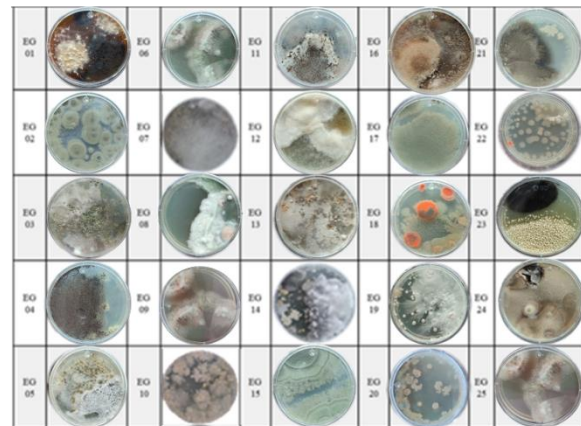


Figura 26. Desarrollo macroscópico de colonias de hongos filamentosos en suspensión primaria de muestras a granel en PDA sin antibiótico



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



En las suspensiones primarias con antibiótico se observa un 100 % de presencia de colonias fúngicas en ambas condiciones, únicamente el 8% de las muestras a granel se encuentra por encima de 1.0×10 UFC/g (muestras EG01 y EG11) (Figura 27 y 28).

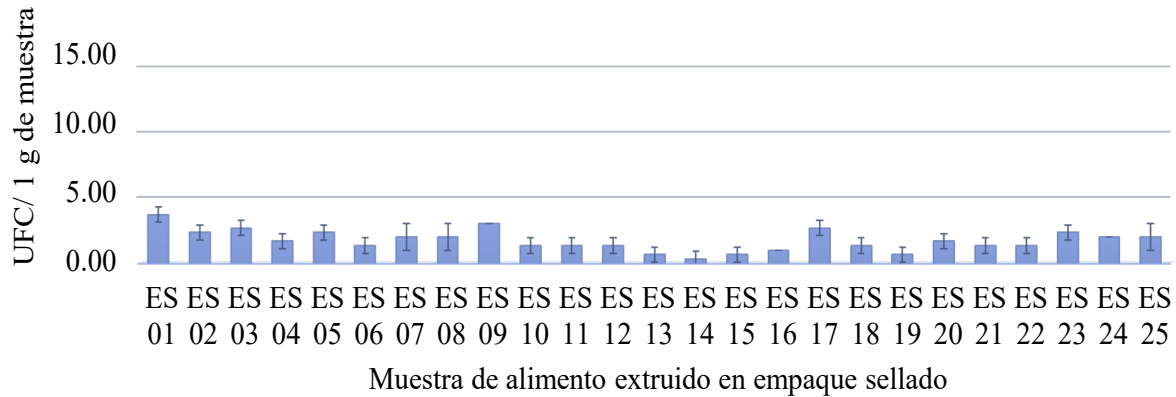


Figura 27. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra con antibiótico de suspensión primaria de alimento extruido en empaque sellado

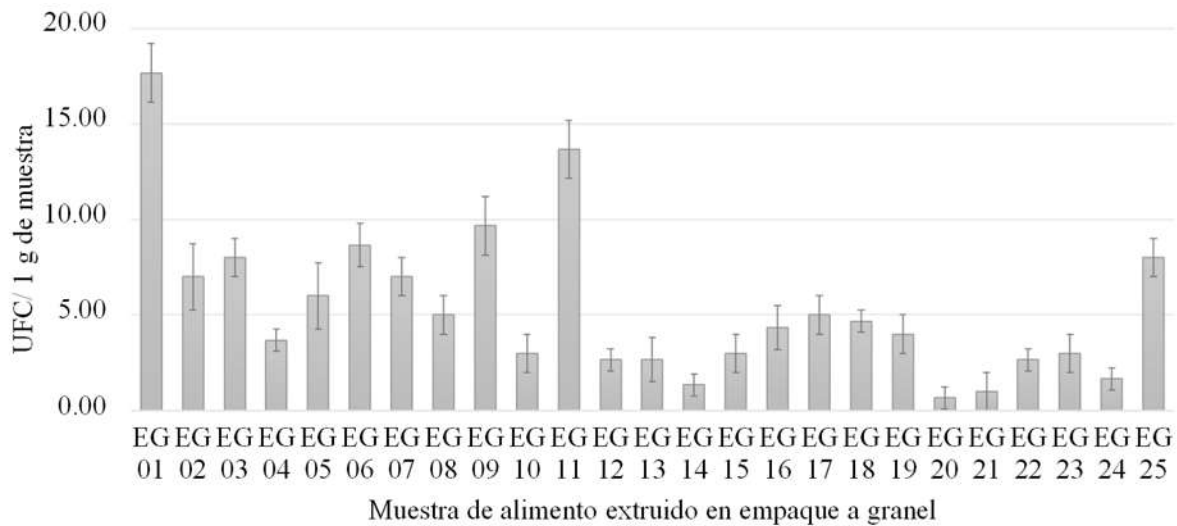



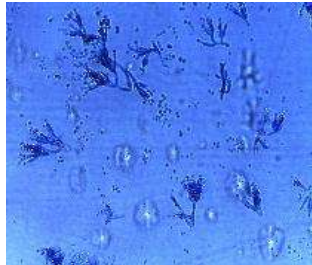
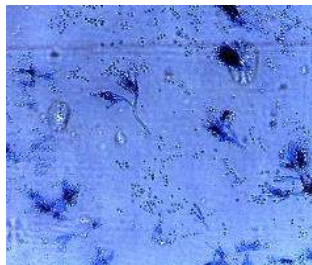

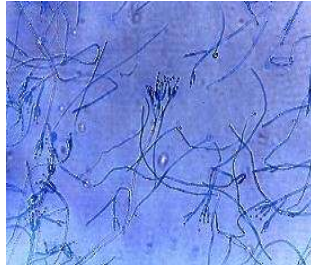
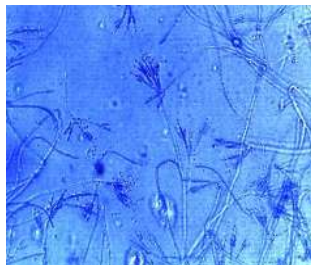


Figura 28. Frecuencia de UFC de hongos filamentosos presentes en siembra con antibiótico de suspensión primaria de alimento extruido a granel



8.3 Incidencia de hongos ocratoxigenicos en muestras de alimento comercial de empaque sellado y a granel

Los aislados fúngicos de los alimentos extruidos suman un total de 30 cultivos axénicos identificados morfológicamente. El análisis de las características macro y microscópicas determinó una mayor incidencia de los géneros *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. como principales hongos contaminantes (Tabla 9). De igual manera, se logro encontrar la presencia de 9 hongos filamentosos desconocidos.


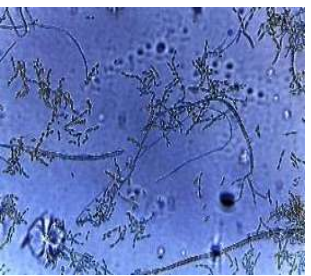

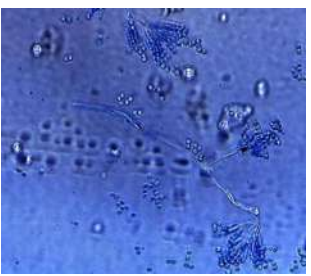


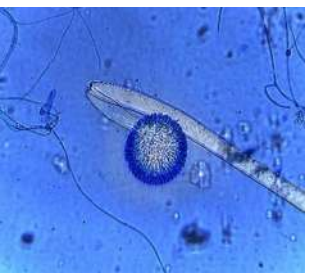

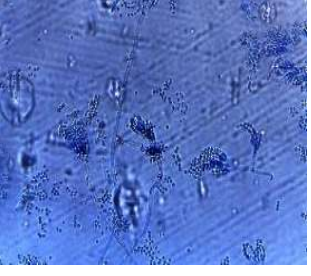
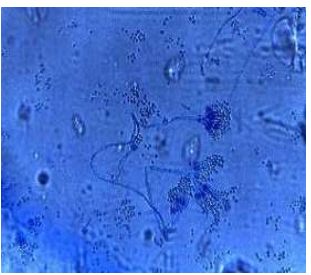

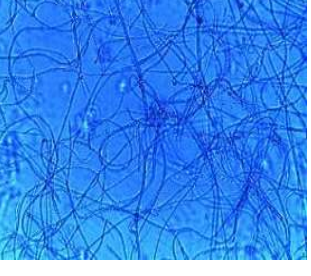
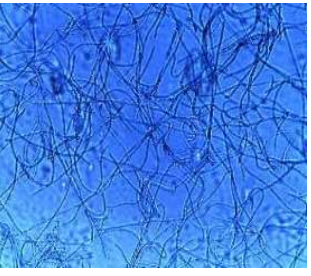

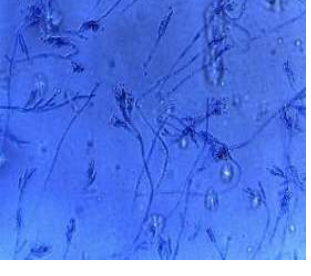
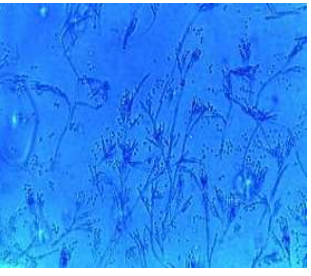
Tabla 9. Identificación morfológica de los principales hongos filamentosos presentes en el alimento extruido en empaque sellado y a granel

<p>M01 ES A1</p> <hr/>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 	<p>M02 EG A1</p> <hr/>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 
<p>M02 EG A2</p> <hr/>		<p>M03 EG A1</p> <hr/>	



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”


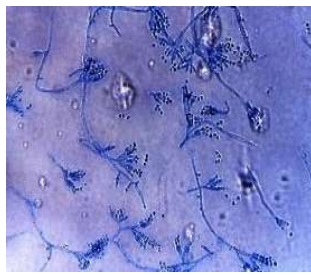
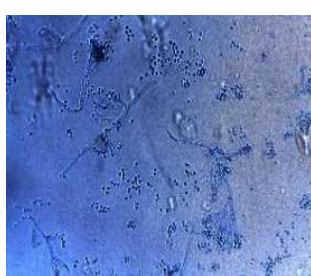
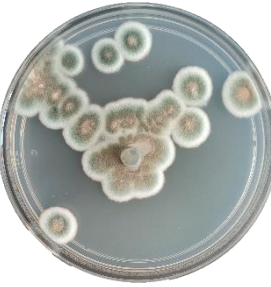
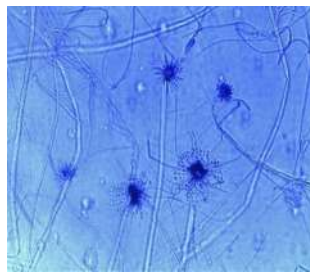
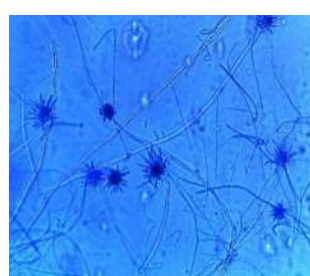
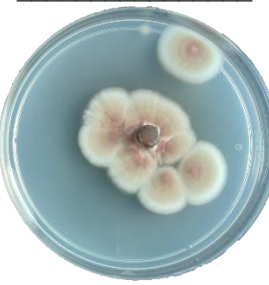
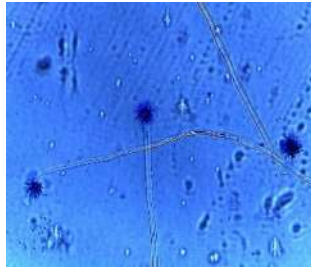
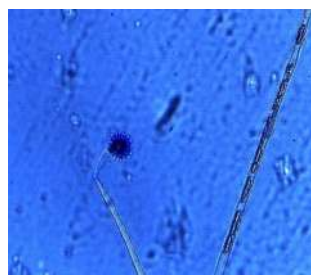

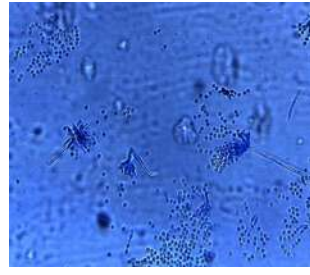

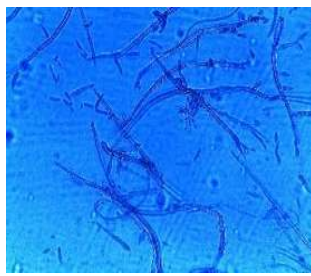
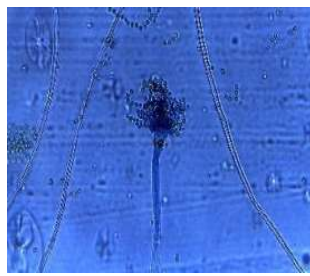


 <p>Desconocido</p>		 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	
<p>M03 EG A2</p>  <p><i>Aspergillus</i> sp.</p>	 	<p>M04 EG A1</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 
<p>M05 EG A2</p>  <p>Desconocido</p>	 	<p>M05 EG A3</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”


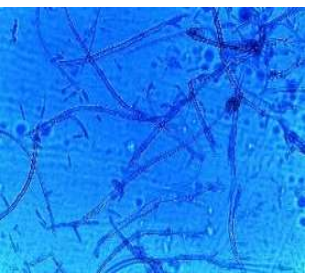

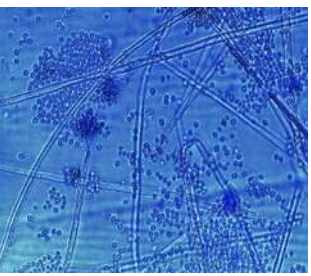

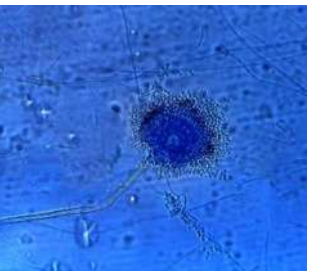
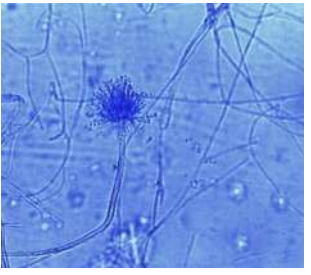

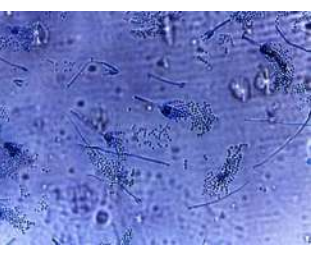
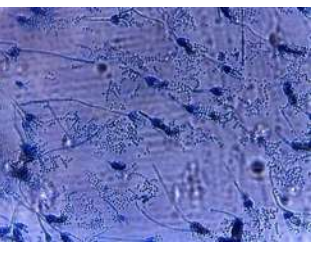
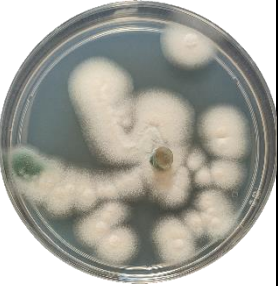
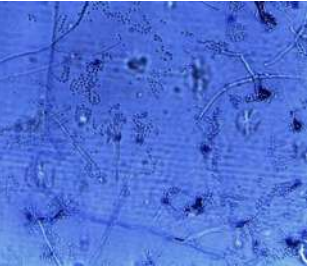
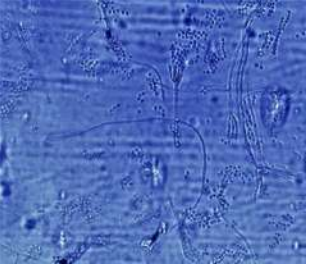

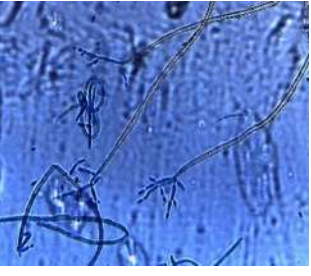



<p>M06 ES A1</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 	<p>M06 ES A2</p>  <p><i>Aspergillus</i> sp.</p>	 
<p>M06 ES A3</p>  <p><i>Aspergillus</i> sp.</p>	 	<p>M06 ES A4</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 
<p>M07 EG A1</p> 		<p>M09 ES A1</p> 	



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”


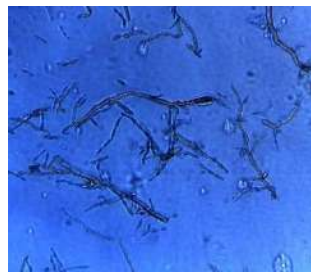
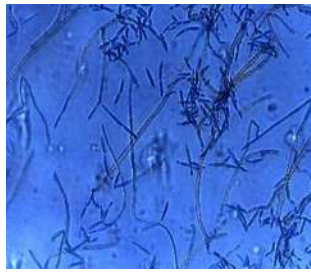


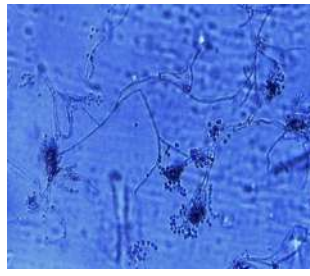

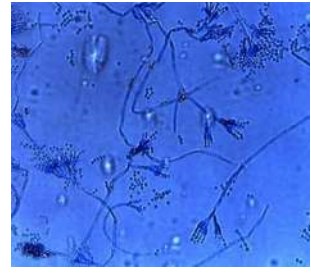
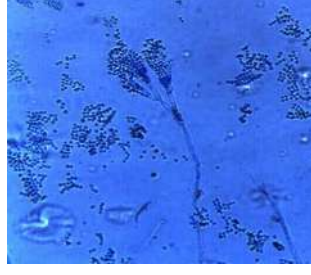

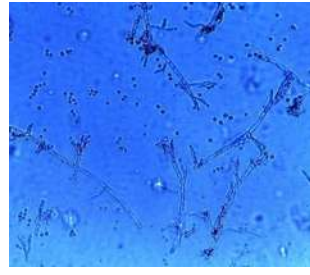
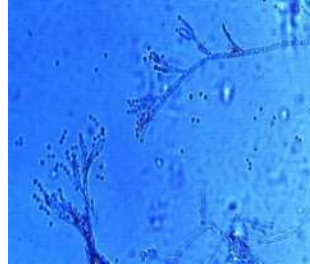

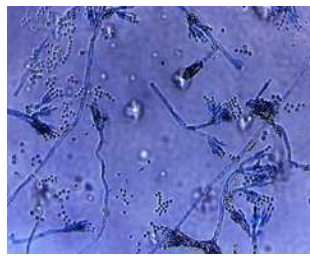


 <p>Desconocido</p>		 <p>Desconocido</p>	
<p>M09 EG A2</p>  <p><i>Aspergillus</i> sp.</p>	 	<p>M11 EG A1</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 
<p>M12 ES A1</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 	<p>M12 ES A2</p>  <p>Desconocido</p>	 



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

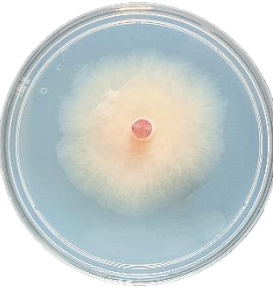
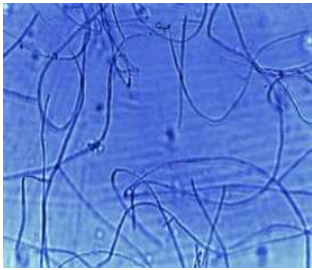

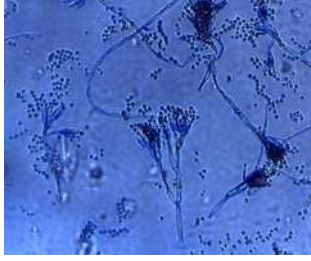


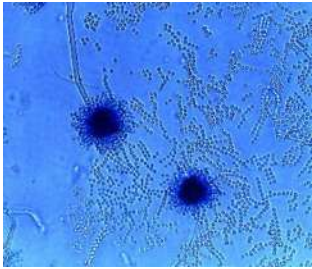

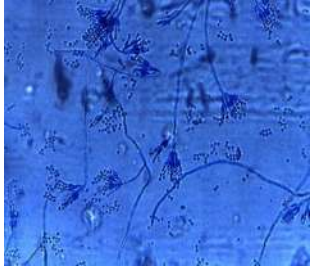
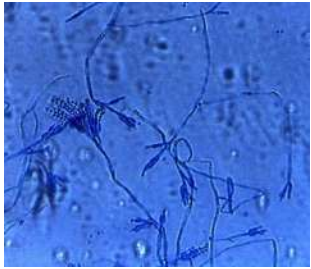

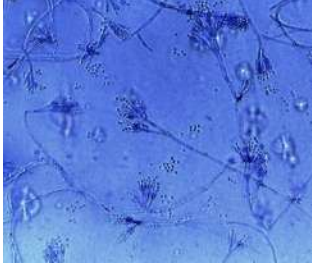
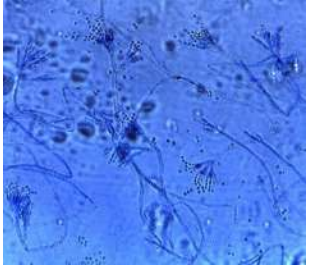
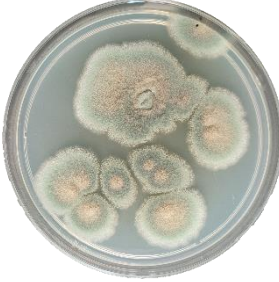
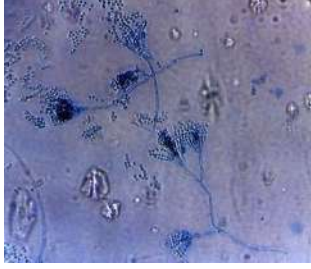
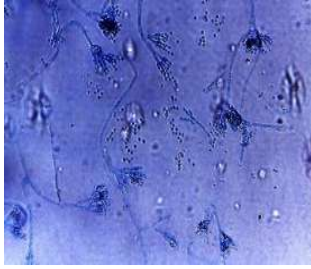


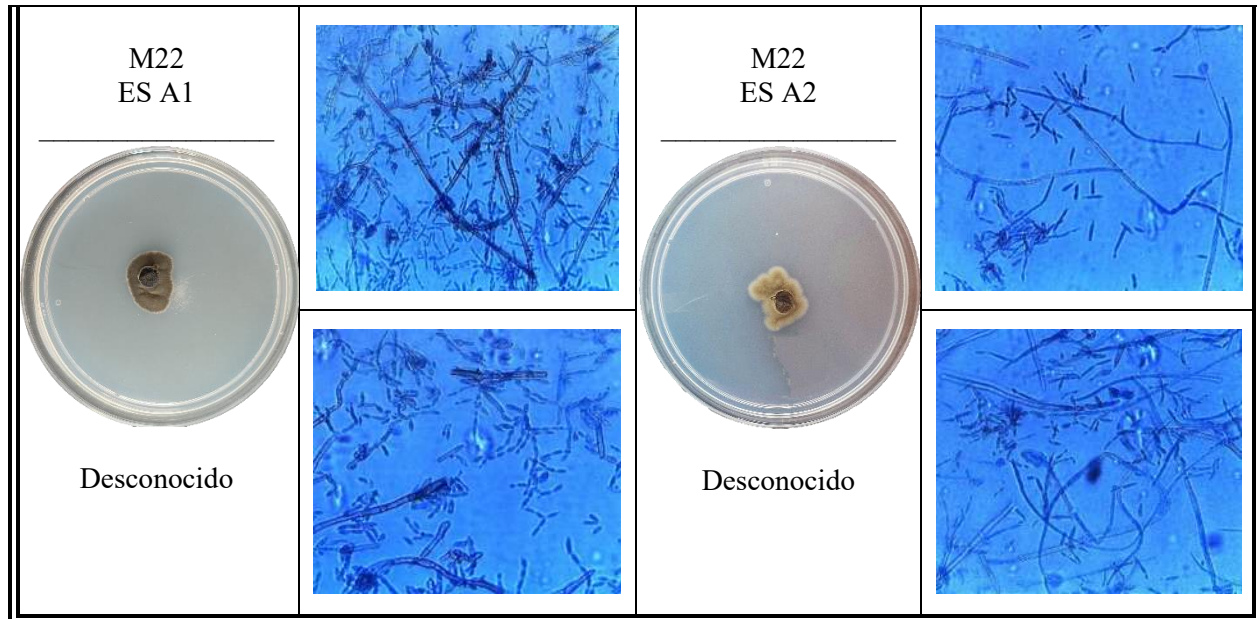
<p>M12 ES A3</p> <hr/>  <p>Desconocido</p>	 	<p>M12 EG A1</p> <hr/>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 
<p>M12 EG A3</p> <hr/>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 	<p>M12 EG A4</p> <hr/>  <p>Desconocido</p>	 
<p>M13 ES A1</p> <hr/>		<p>M14 ES A1</p> <hr/>	



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



 <p>Desconocido</p>		 <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	
<p>M16 ES A1</p>  <p><i>Aspergillus</i> sp.</p>	 	<p>M17 ES A1</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 
<p>M19 ES A1</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 	<p>M19 ES A2</p>  <p><i>Penicillium</i> sp.</p>	 



8.4 Determinación de OTA en muestras de alimento comercial extruido por la técnica de ELISA

Se analizaron un total de 25 muestras en empaque sellado y 25 muestras a granel, en donde se observó que el 100% (n=50) de las muestras de alimento extruido fueron positivas para OTA, además de determinar que 12% supera a los límites permisibles establecidos por la Unión Europea (U.E.) (Figura 29).

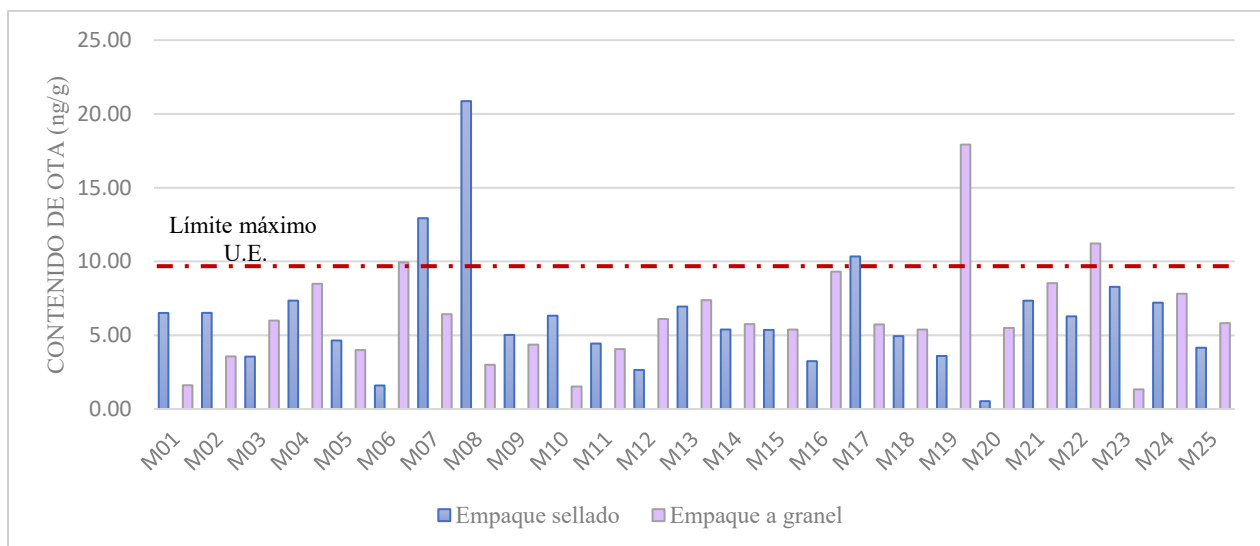


Figura 29. Incidencia de OTA en muestras de alimento comercial extruido para perros



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



En la comparativa de medias de las muestras de empaque sellado y muestras de venta a granel se determinó que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de ocratoxina A ($p= 0.9980$) (Figura 30). La concentración promedio de OTA fue de 6.2407 ± 4.026 ng/g en las muestras de empaque sellado y de 6.2433 ± 3.536 ng/g en las muestras evaluadas a granel, considerando una diferencia entre medias de 0.002585 ± 1.072 . El intervalo de concentraciones de OTA en las muestras de empaque sellado fue entre 0.5314 ng/g y 20.8687 ng/g, en lo que respecta a las muestras de empaque a granel fue entre 1.3262 ng/g y 17.9297 ng/g.

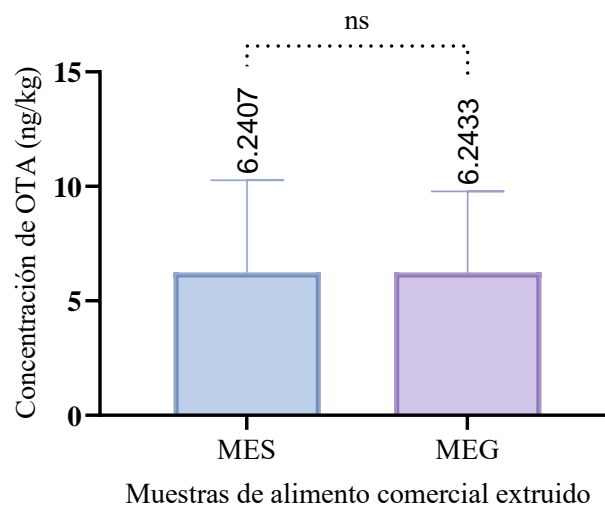


Figura 30. Comparativa de OTA presente en muestras de alimento de empaque sellado (MES) y empaque a granel (MEG) (ns= No significativo).

Se realizó una comparativa de medias entre las muestras de calidad estándar y premium/súper premium de empaque sellado, determinando que no hay diferencia significativa ($p= 0.4920$) entre los grupos (Figura 31). La concentración promedio de OTA en 17 muestras de calidad estándar fue de 6.631 ± 4.608 ng/g y en 8 muestras evaluadas de calidad premium/súper premium fue de 5.412 ± 2.422 ng/g. Se obtuvo una concentración mínima de 1.594 ng/g en las muestras de calidad estándar y de 0.531 ng/g en las muestras de calidad premium/súper premium. Asimismo las concentraciones máximas fueron de 20.868 ng/g y de 8.281 ng/g, respectivamente.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

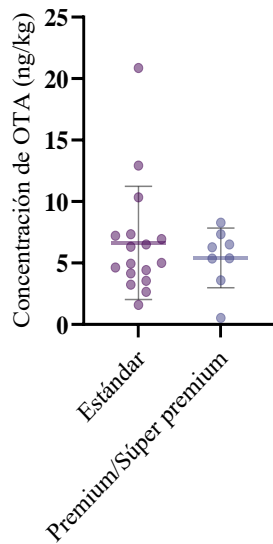


Figura 31. Incidencia de OTA en alimento extruido en empaque sellado de calidad estándar y premium/súper premium

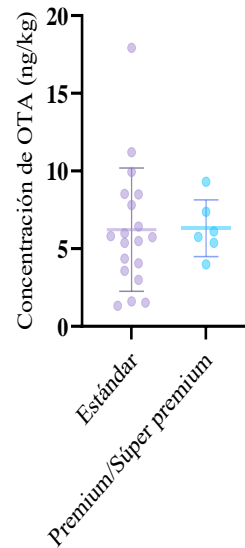


Figura 32. Incidencia de OTA en alimento extruido en empaque a granel de calidad estándar y premium/súper premium

En lo que respecta a las muestras de venta a granel, se puede observar que no hay diferencia significativa entre ambos tipos de muestras ($p= 0.9536$) (Figura 32). Se obtuvieron un total de 19 muestras de calidad estándar con una concentración promedio de OTA de 6.219 ± 3.968 ng/g, siendo la muestra con mínima concentración de OTA de 1.326 ng/g y la máxima de 17.929 ng/g. Asimismo, se obtuvo un total de 6 muestras de calidad premium/súper premium con una concentración media de 6.319 ± 1.829 ng/g, identificando una muestra con concentración mínima de 3.992 ng/g y una máxima de 9.311 ng/g.

Se realizó un ANOVA de una vía en base a la clasificación de la PROFECO, en donde no se encuentran diferencias significativas entre los grupos de muestras de empaque sellado ($p= 0.8553$) (Figura 33) que se encuentran dentro de esta clasificación (13 muestras), donde la concentración promedio de ocratoxina A en 5 muestras de tipo AB fue de 6.233 ± 1.294 ng/g con una concentración mínima de 4.644 ng/g y una máxima de 7.348 ng/g; en 4 muestras de tipo AE fue de 4.254 ± 1.987 ng/g con una concentración mínima de 1.594 ng/g y una máxima de 6.326 ng/g; 2 muestras de tipo AP con 5.469 ± 2.650 ng/g y una muestra mínima de 3.595 ng/g y una máxima de 7.343 ng/g; en 2 muestras de tipo AS, la concentración promedio es de 7.399 ± 1.247



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



ng/g, con una mínima de 6.518 ng/g y una máxima de 8.281 ng/g; y por último, las muestras de alimento extruido que no se encontraban dentro de la clasificación de la PROFECO (12 muestras), presentaron una concentración promedio de 6.841 ± 5.54 ng/g, con una mínima de 0.5314 ng/g y una máxima de 20.87 ng/g. En el ANOVA correspondiente a las muestras de empaque a granel, no se encontraron diferencias significativas ($p= 0.8910$) (Figura 34) entre los grupos en base a la clasificación (15 muestras dentro de las clasificaciones), en donde se obtuvo una concentración promedio de OTA de 7.439 ng/g ± 6.003 en 6 muestras de tipo AB, con una muestra mínima de 1.326 ng/g y una máxima de 17.929 ng/g; en 3 muestras de tipo AE se encontró una concentración media de 5.279 ± 2.863 ng/g, con una mínima de 2.989 ng/g y una máxima de 8.488 ng/g; en 3 muestras de tipo AP se encontró una media de 6.892 ± 2.692 ng/g, con una mínima de 3.992 ng/g y una concentración máxima de 9.311 ng/g; en 3 muestras de tipo AS se determinó un promedio de 5.746 ± 0.361 ng/g, con una mínima de 5.381 ng/g y una máxima de 6.104 ng/g; para finalizar, 10 de las muestras evaluadas no se encontraban dentro de la clasificación de la PROFECO, pero se estableció una concentración promedio de OTA de 5.770 ng/g ± 2.852 ng/g, con una mínima de 1.524 ng/g y un valor máximo de 11.210 ng/g.

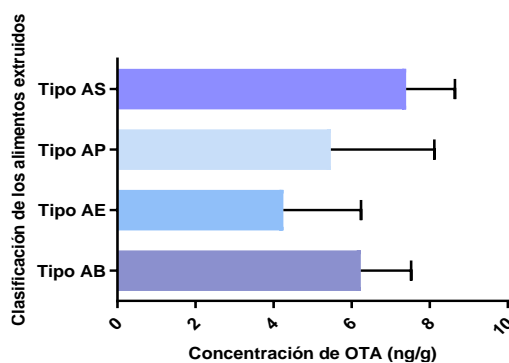


Figura 33. Análisis de varianza entre las muestras en empaque sellado catalogadas en base a la clasificación de la PROFECO

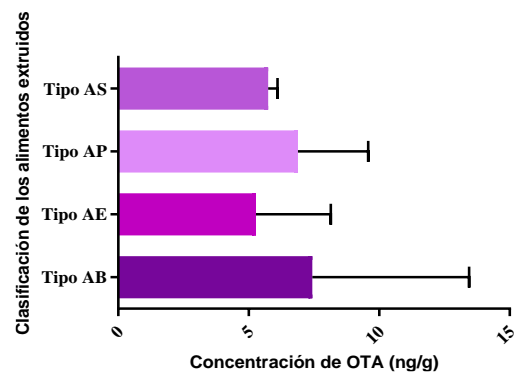


Figura 34. Análisis de varianza entre las muestras a granel catalogadas en base a la clasificación de la PROFECO



8.5 Incidencia de aislamientos fúngicos y concentración de OTA en alimentos extruidos

Se estableció una recopilación del número de cultivos axenicos por muestra analizada y los principales géneros fúngicos identificados morfológicamente en base a sus características macro y microscópicas, con la finalidad de conocer la exposición de OTA y de contaminantes fúngicos presentes en los alimentos extruidos (Tabla 10).

Tabla 10. Resumen de la incidencia de los principales géneros fúngicos identificados en las muestras analizadas y su concentración de OTA en el alimento

ID muestra	No. de cultivos fúngicos axenicos aislados	Géneros fúngicos identificados morfológicamente	Concentración de OTA (ng/g)
Muestras de empaque sellado			
M01 ES	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 Desconocido	6.51109057
M02 ES	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	6.51802218
M03 ES	3	2 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	3.55360444
M04 ES	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	7.34750462
M05 ES	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	4.64417745
M06 ES	4	2 <i>Penicillium</i> sp. 2 <i>Aspergillus</i> sp.	1.59426987
M07 ES	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	12.9343808
M08 ES	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	20.8687616
M09 ES	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	5.02079482
M10 ES	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	6.32624769
M11 ES	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	4.43622921
M12 ES	3	1 <i>Penicillium</i> sp. 2 Desconocido	2.64787431
M13 ES	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 Desconocido	6.94547135
M14 ES	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	5.38817006
M15 ES	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	5.36044362
M16 ES	1	1 <i>Aspergillus</i> sp.	3.24399261
M17 ES	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	10.3419593
M18 ES	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	4.93992606
M19 ES	3	2 <i>Penicillium</i> sp.	3.59519409
M20 ES	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	0.53142329
M21 ES	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	7.34288355
M22 ES	2	1 Desconocido 1 Desconocido	6.28003697
M23 ES	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	8.28096118



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”

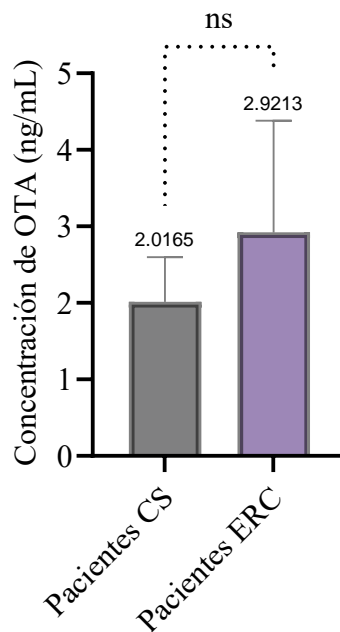


M24 ES	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	7.20887246
M25 ES	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	4.15434381
Muestras de empaque sellado			
M01 EG	4	3 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	1.60813308
M02 EG	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 Desconocido	3.56746765
M03 EG	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	5.98428835
M04 EG	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	8.48890943
M05 EG	3	2 <i>Penicillium</i> sp. 1 Desconocido	3.99260628
M06 EG	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	9.93530499
M07 EG	1	1 Desconocido	6.42791128
M08 EG	3	2 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	2.98983364
M09 EG	1	1 <i>Aspergillus</i> sp.	4.35767098
M10 EG	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	1.52495379
M11 EG	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	4.06654344
M12 EG	4	3 <i>Penicillium</i> sp. 1 Desconocido	6.10443623
M13 EG	2	2 <i>Aspergillus</i> sp.	7.37060998
M14 EG	2	2 <i>Aspergillus</i> sp.	5.75323475
M15 EG	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	5.38123844
M16 EG	3	2 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	9.31146026
M17 EG	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	5.74168207
M18 EG	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	5.37892791
M19 EG	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	17.9297597
M20 EG	1	1 <i>Penicillium</i> sp.	5.48521257
M21 EG	3	1 <i>Penicillium</i> sp. 2 <i>Aspergillus</i> sp.	8.52125693
M22 EG	2	2 <i>Penicillium</i> sp.	11.2107209
M23 EG	2	2 <i>Aspergillus</i> sp.	1.32624769
M24 EG	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 2 <i>Aspergillus</i> sp.	7.80961183
M25 EG	2	1 <i>Penicillium</i> sp. 1 <i>Aspergillus</i> sp.	5.81330869



8.6 Determinación de OTA en muestras de suero sanguíneo por la técnica de ELISA

Se evaluaron un total de 10 muestras de pacientes clínicamente sanos y 7 muestras de pacientes diagnosticados con enfermedad renal crónica (cinco perros en estadio 2 y dos en estadio 4 de acuerdo con la clasificación de IRIS) y se determinó la concentración de OTA por la técnica de ELISA. Se observó que el 100% de las muestras analizadas fueron positivas a la presencia de OTA en suero sanguíneo. La concentración promedio de OTA en pacientes clínicamente sanos fue de 2.016 ng/mL y de 2.921 ng/mL en pacientes con ERC, con una diferencia entre medias de 0.9049 ± 0.5061 ng/mL (Figura 35). Además, la concentración más alta de OTA se presenta en un canino con ERC en estadio 4 con 4.73567 ng/mL. El intervalo de concentraciones de OTA en suero fue de 0.974 ng/mL a 2.621 ng/mL y de 0.142 ng/mL a 4.736 ng/mL, respectivamente. Sin embargo, no se determinaron diferencias significativas entre ambos grupos ($p= 0.0940$).



Muestras de suero sanguíneo de pacientes caninos

Figura 35. Evaluación de las medias de la concentración de OTA en pacientes clínicamente sanos en comparación con los pacientes con ERC (ns= No significativo)

Se evaluó la correlación de la concentración de creatinina y urea en plasma y los niveles de OTA para los perros con ERC, en donde se determinó que existe una correlación positiva moderada



con respecto a la creatinina ($r= 0.4286$) (Figura 36) y en la urea se encontró una correlación positiva baja ($r= 0.3424$) (Figura 37), aunque no se presenta significancia ($p= 0.3536$ y $p= 0.4579$, respectivamente).

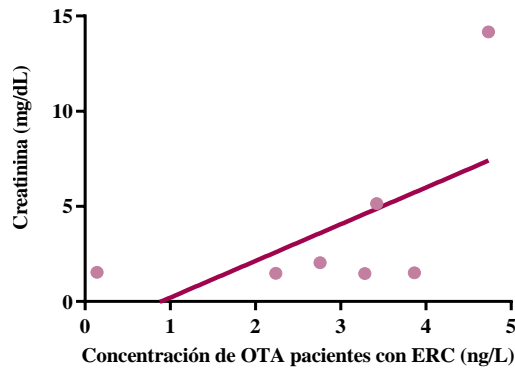


Figura 36. Correlación de Spearman entre la creatinina y la concentración sanguínea de OTA en pacientes caninos con ERC

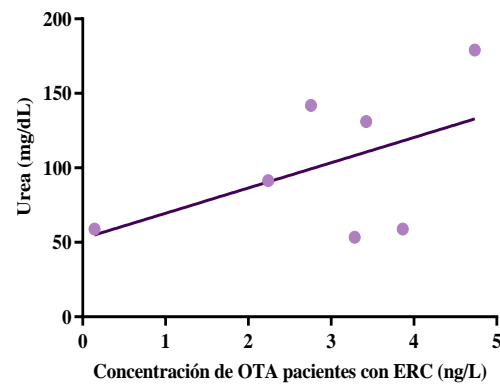


Figura 37. Correlación de Spearman entre la urea y la concentración sanguínea de OTA en pacientes caninos con ERC

8.7 Estimación de la exposición a OTA mediante la frecuencia de consumo de alimentos

Se examinaron los cuestionarios con la historia dietética y frecuencia de ingesta de los pacientes caninos analizando el tipo, la cantidad y la marca de alimentos consumidos (Tabla 11), observando que la mayoría de pacientes consumen una dieta mixta en donde se incluyen a las croquetas como alimento mayormente consumido (4-7 veces a la semana), seguido de otros alimentos derivados de cereales (tortilla de maíz, arroz, pan de caja y pan dulce), algunos productos cárnicos (carne de pollo, embutidos, carne de res) y latas comerciales. Asimismo es importante resaltar que la marca EG04 (consumida por el perro sano P05 y los perros P04 y P13 con ERC), ES01 (P01 con ERC), EG01 (consumida por los perros sanos P10 y P16 y el perro P01 con ERC), ES18 y EG09 (consumida por el perro P14 con ERC) son las marcas de alimento extruido más consumidas por los caninos muestreados, además de observar que la mayoría de los propietarios adquieren el alimento en empaque sellado y han sido consumidos por sus mascotas por más de un año.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



Tabla 11. Análisis de los cuestionarios sobre la historia dietética y frecuencia de ingesta de alimentos que consumen los caninos muestreados

Tipo de dieta que consumen (croquetas/casera/mixta)	Alimentos mayormente consumidos	Frecuencia de consumo a la semana	Marca del alimento comercial	Tiempo de consumo del alimento comercial	Tipo de empaque (sellado/granel)	[OTA en alimento consumido]	[OTA en suero]			
Pacientes clínicamente sanos										
P02	Croquetas	Croqueta	4-7 veces	ES22	6 meses	Empaque sellado	6.2800 ng/g			
				Otra marca	< 1 año		Desconocido	2.14048 ng/mL		
P05	Mixta	Croqueta	4-7 veces	EG04	> 1 año	Empaque a granel	8.4889 ng/g			
		Tortilla de maíz	1 vez							
		Pan dulce	1 vez							
		Embutidos	2-4 veces							
		Carne de res	2-4 veces							
P06	Mixta	Croqueta	4-7 veces	ES10	> 1 año	Empaque sellado	6.3262 ng/g			
		Lata comercial	1 vez							
P08	Mixta	Arroz	1 vez	ES14	> 1 año	Empaque sellado	5.3881 ng/g			
		Embutidos	1 vez							
		Carne de pollo	1 vez							
		Croqueta	4-7 veces							
P09	Mixta	Lata comercial	4-7 veces	Otra marca	> 1 año	Empaque sellado	Desconocido			
		Pan de caja	1 vez	ES21	Empaque sellado			7.3428 ng/g		
		Carne de res	1 vez							
		Croqueta	4-7 veces							
P10	Mixta	Tortilla de maíz	1 vez	ES03	6 meses	Empaque sellado	3.5536 ng/g			
		Embutidos	1 vez							
		Carne de pollo	1 vez							
		Croqueta	4-7 veces							
P11	Mixta	Carne de res	1 vez	EG01	> 1 año	Empaque granel	1.6081 ng/g			
		Tortilla	2-4 veces							
		Carne de pollo	2-4 veces							
P12	Mixta	Croqueta	4-7 veces	ES08	> 1 año	Empaque sellado	20.8687 ng/g			
		Carne de pollo	4-7 veces							
P16	Croquetas	Croquetas	4-7 veces	EG01	> 1 año	Empaque granel	1.6081 ng/g			
				EG02		Empaque granel	3.5674 ng/g			
				ES03	6 meses	Empaque sellado	3.5536 ng/g			
P01	Mixta	Croquetas	4-7 veces	ES01	> 1 año	Empaque sellado	6.5110 ng/g			
		Tortilla de maíz	4-7 veces							
		Arroz	4-7 veces							
		Carne de res	2-4 veces					EG01	Empaque granel	1.6081 ng/g
		Carne de pollo	4-7 veces							
P03	Mixta	Croquetas	4-7 veces	ES19	> 1 año	Empaque sellado	3.59519409			
		Tortilla de maíz	1 vez	EG13	Empaque granel			7.3706 ng/g		
		Arroz	1 vez							
		Embutidos	1 vez							
		Carne de res	1 vez							
Carne de pollo	1 vez									
P04	Mixta	Croqueta	4-7 veces	EG04	> 1 año	Empaque a granel	8.48890943 ng/g			
		Tortilla de maíz	4-7 veces							
		Pan dulce	4-7 veces							
		Arroz	4-7 veces					ES02	6 meses	Empaque sellado
		Embutidos	1 vez							
		Carne de res	4-7 veces							
		Carne de pollo	4-7 veces							
				Carne de cerdo	1 vez					
Pacientes con enfermedad renal crónica estadio 2										



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



P07	Mixta	Croquetas	4-7 veces	ES05	> 1 año	Empaque sellado	4.64417745 ng/g	2.75785 ng/mL
		Tortillas	2-4 veces					
		Arroz	1 vez					
		Carne de pollo	2-4 veces					
P13	Mixta	Croquetas	4-7 veces	EG04	> 1 año	Empaque granel	8.48890943 ng/g	2.24029 ng/mL
		Tortilla de maíz	4-7 veces					
		Pan dulce	4-7 veces					
		Arroz	4-7 veces	EG09	> 1 año	4.35767098 ng/g		
		Carne de pollo	1 vez					
Pacientes con enfermedad renal crónica estadio 4								
P14	Mixta	Croqueta	4-7 veces	ES18	> 1 año	Empaque sellado	4.93992606 ng/g	3.42329 ng/mL
		Tortilla de maíz	2-4 veces					
		Carne de pollo	2-4 veces	EG09		Empaque granel	4.35767098 ng/g	
P15	Mixta	Croqueta	4-7 veces	ES24	> 1 año	Empaque sellado	7.80961183 ng/g	4.73567 ng/mL
		Carne de pollo	2-4 veces					

También se evaluaron las concentraciones de OTA en pacientes clínicamente sanos y con ERC con relación al alimento que consumen los pacientes, encontrándose una correlación positiva moderada ($r= 0.6220$) en pacientes sanos y una correlación positiva alta ($r= 0.7500$) en los caninos con ERC con un nivel de confianza del 94% para ambos.

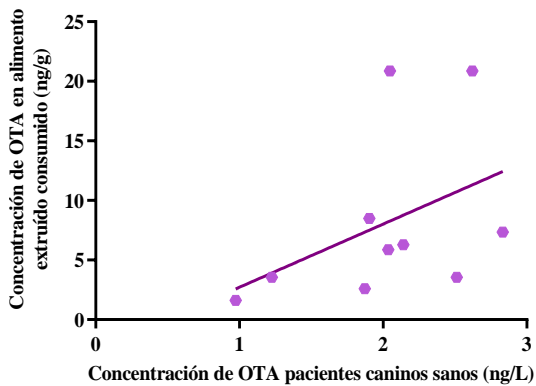


Figura 39. Correlación de Spearman entre la concentración de OTA en alimento consumido y la concentración sanguínea de OTA en caninos sanos

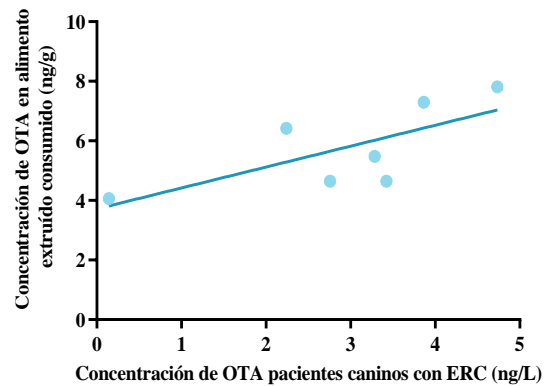


Figura 38. Correlación de Spearman entre la concentración de OTA en alimento consumido y la concentración sanguínea de OTA en caninos con ERC



9. DISCUSIÓN

La Comisión Europea (2011), describe los piensos como cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos ya sea procesado, semiprocado o sin procesar, destinado a la alimentación oral de los animales. Sin embargo, los cereales y los productos a base de cereales son posiblemente los ingredientes más utilizados en la alimentación animal, ya que aportan la mayor parte de los nutrientes. Es por eso que existe una creciente disponibilidad de ingredientes agroindustriales de diversa composición bromatológica, que orienta la diversificación de fórmulas de alimentación adecuadas para perros con diferencias en sus necesidades digestivas, perfiles nutricionales y metabolismo (Pereira, 2020 y Martínez, 2021).

En México, la PROFECO elaboró una clasificación de los alimentos extruidos comercializados comúnmente a nivel nacional de acuerdo con sus características nutricionales y atributos especiales, así como los controles de calidad que garantizan que los alimentos comerciales para mascotas evaluados en esta clasificación tienen una producción adecuada y homogénea, tomando como base las recomendaciones de Association of American Feed Control Officials (AAFCO). Esta clasificación solamente contempla a 40 marcas de alimentos extruidos para perros encontrados en el mercado mexicano, tomando en cuenta aspectos como el lugar de procedencia de las marcas, la cantidad de proteína y grasa, el costo al mercado, la información comercial de los alimentos para corroborar que cumplan con las NOM y que no engañen al consumidor; sin embargo, es importante incluir a una mayor cantidad de marcas, ya que su consumo varía de acuerdo a cada estado del país y es necesario incluir normativas relacionadas con la presencia de micotoxinas y contaminación fúngica para asegurar la inocuidad y calidad de los alimentos extruidos garantizando seguridad alimentaria en sus consumidores. En la evaluación de las características de los alimentos extruidos del presente proyecto se encontró que el 20% de las muestras evaluadas de empaque sellado y el 25% de las muestras de empaque a granel se consideran dentro del tipo AB ya que, cubren los requerimientos nutricionales indispensables para un perro adulto; sin embargo, el 48% y el 40% de las muestras no aplican dentro de esta clasificación, respectivamente. Asimismo, se determinó que el 96% de las muestras de empaque sellado están formuladas a base de cereales y sus derivados, (principalmente maíz, trigo y arroz) y el 4% asegura ser libre de grano (no incluyen maíz ni trigo dentro de su formulación); sin embargo, estos cereales son sustituidos por cereales menores, como el salvado de arroz, mijo y arroz integral,



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



lo cual coincide con lo reportado por Di Cerbo (2017), que menciona que el maíz, el trigo, el arroz y la cebada son los cereales más utilizados para la producción de alimentos secos y que en los alimentos para mascotas sin grano, los cereales se sustituyen por papas y pulpa de betabel. En lo que respecta a las muestras a granel, el 100% contiene cereales dentro de su formulación. Witaszak (2020), menciona que en el mercado existen una amplia gama de alimentos extruidos para mascotas donde uno de los ingredientes más comunes son los cereales; sin embargo, estos se consideran como vectores de micotoxinas nocivas que suponen un riesgo para la salud de las mascotas.

El 28% de las marcas muestreadas de croquetas en empaque sellado aseguran estar suplementados con levaduras secas activas con potencial probiótico dentro de su formulación, favoreciendo a la microbiota en el intestino y el 32% mencionan estar enriquecidas con prebióticos no digeribles en la dieta pero que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas en el tracto digestivo del perro. Sin embargo, el empleo de altas temperaturas para el procesamiento de estos alimentos ocasiona que los probióticos contenidos sean degradados, ya que en el proceso de peletización para la fabricación de alimentos se utiliza vapor (calor húmedo) para acondicionar el alimento antes de forzarlo a través de una matriz de pellets, considerándose a este proceso como uno de los métodos más eficaces para matar microorganismos porque desnaturaliza los sistemas enzimáticos y su actividad metabólica dentro del organismo, lo que inhibe su supervivencia. Por lo tanto, cuando se añaden productos de levadura seca activa a los alimentos para animales, existe la preocupación de que su viabilidad se reduzca, o potencialmente se elimine, haciéndolos ineficaces como probióticos. Sin embargo, se han realizado muy pocos estudios para evaluar la supervivencia de las levaduras en diversas condiciones de fabricación de los piensos (Muñoz *et al.*, 2015 & Shurson, 2018). En este trabajo se realizaron cultivos del alimento molido en medio PDA para la determinación de la presencia de levaduras; sin embargo, no se detectó la existencia de estos microorganismos, lo cual coincide con lo mencionado en la literatura ya que, estos microorganismos pueden llegarse a degradar por las condiciones implementadas durante el proceso de extrusión de los alimentos, resultando ineficaces como probióticos.

Es importante conocer el tipo de conservadores que se añaden a los alimentos extruidos, ya que pueden verse implicados en la inhibición del crecimiento de especies fúngicas, bacterias, mohos y levaduras, además de que previenen el deterioro y retardan cambios en las características organolépticas del alimento extruido, extendiendo su vida útil en anaquel. En el análisis de las



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



muestras de alimento extruído se determinó que el propionato de calcio es el aditivo conservador mayormente empleado, así como el BHA y BHT como antioxidantes. Cubero, Monferrer & Villalta (2002), hace referencia a que el propionato de calcio puede emplearse en alimentos con pH relativamente elevado, entre 5.0 y 6.0; así mismo, es muy activo frente a la mayoría de los hongos, aunque hay cepas de *Penicillium* que lo toleran en concentraciones del 5%, además de que no presenta actividad sobre levaduras. De ideal manera, Da Rocha (2020) menciona que los conservadores juegan un papel fundamental en la protección del producto terminado, especialmente cuando se trabaja con materias primas que son susceptibles a la contaminación, ya que su principal objetivo es proteger los alimentos contra el deterioro causado por microorganismos. Una preocupación importante se centra en el desarrollo de hongos, por lo que el uso de antifúngicos es esencial para el control. Algunos ejemplos son: sorbato de sodio, sorbato de potasio, propionato de calcio, ácido cítrico, ácido propiónico, propionato de calcio, entre otros.

El pH de los alimentos extruidos es uno de los principales factores que determinan la supervivencia y el crecimiento de los microorganismos durante el procesado, almacenaje y distribución. Este valor es variable, siendo mayoritariamente neutro o ácido. Del mismo modo, cada microorganismo tiene un pH mínimo, máximo y óptimo, en función de su crecimiento. Las muestras de alimento comercial extruido en empaque sellado poseen un intervalo de pH de 5.0 a 7.0, por lo tanto, estos alimentos comerciales cumplen con las condiciones de pH óptimas para ser catalogados dentro de la NOM-130-SSA1-1995, la cual argumenta que los alimentos envasados en recipientes de cierre hermético con $\text{pH} > 4.6$ deben ser sometidos a un tratamiento térmico capaz de destruir o inactivar los gérmenes patógenos y toda espora de microorganismos patógenos, asegurando su esterilidad comercial. Papagianni (2007), menciona que los hongos pueden crecer en un rango relativamente amplio de pH; sin embargo, muestran diferentes morfologías a diferentes pH, ya que este afecta al transporte de nutrientes al interior de la célula, a la solubilidad de los nutrientes, a la actividad de las enzimas y a las características de las superficies celulares; todo ello influye en el crecimiento y la productividad de los hongos. Asimismo, en un trabajo llevado a cabo por Wheeler, Hurdman & Pitt (1991) se evaluó el efecto del pH en las tasas de crecimiento en hongos toxigénicos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, en el rango de pH de 2.0 a 11.0 a 25, 30 y 37°C, en donde establecieron que las especies de *Aspergillus* fueron más tolerantes al pH alcalino, mientras que las especies de *Penicillium* parecían ser más tolerantes al pH ácido. De igual manera,



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



en el trabajo realizado por Colin, Baigorí & Pera (2013) determinaron que un pH ácido de 2.0 se ve favorecido el crecimiento de filamentos de *Aspergillus niger* y en condiciones de 2.0 a 8.0 se observa el crecimiento de gránulos fúngicos.

En cuanto al recuento hongos, se envaluaron las unidades formadoras de colonia por gramo de muestra, en donde se emplearon condiciones de siembras directas y en suspensión primaria con y sin antibiótico. Se logró observar que en la siembra directa de muestras de empaque sellado se obtuvo un 8% en PDA sin antibiótico y un 72% en de muestras en PDA con antibiótico positivas a la presencia de colonias fúngicas, en donde el 24% y el 12% superaban 1.0×10^1 UFC/g, respectivamente. En las muestras de empaque a granel se observó un 100% de muestras en PDA sin antibiótico y un 96% en muestras en PDA con antibiótico positivas, en donde el 64% y el 32%, respectivamente, superaban 1.0×10^1 UFC. Asimismo, en las suspensiones directas se determinó un 100% de muestras positivas tanto en empaque sellado como a granel, cabe mencionar que solamente el 16% de las muestras en PDA sin antibiótico y el 8% en PDA con antibiótico en empaque a granel superaban 1×10^1 UFC/g. Por lo tanto, se puede determinar que las marcas a granel son las de mayor frecuencia de poblaciones fúngicas con respecto a las muestras en empaque sellado, lo cual, sugiere que dichas muestras de alimentos son más susceptibles a la contaminación por hongos micotoxigénicos. Estos resultados son menores a los obtenidos por Copetti (2009), en dónde sometieron muestras de alimento comercial en dilución a una siembra por extensión de superficie, obteniendo como resultado que de 40 muestras positivas a la presencia de hongos micotoxigenicos solamente 39 (97.5%) presentaban un nivel de contaminación que oscilaba entre 10×10^1 a 10×10^2 UFC/g.

Asimismo, en la literatura se menciona que cuando el material crudo extruido para la formulación de alimentos extruidos presenta un exceso de contenido de humedad relativa (20-25%) en la etapa inicial del proceso, y se reduce mediante el secado (8-10%), sólo se inhibe el crecimiento de las formas vegetativas de la microflora fúngica, pero las esporas y micotoxinas producidas dentro del material procesado permanecen estables, por lo tanto, la ausencia de especies descritas como micotoxigénicas en muestras de alimentos, no significa que no se encuentren micotoxinas en las mismas, debido a que las toxinas fúngicas pueden persistir después de la muerte de la forma vegetativa del hongo por procesos industriales en la producción del alimento (Muñoz, 2015 y Martínez *et al.*, 2021).



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



Con relación a la incidencia de hongos ocratoxigenicos, las especies de hongos aislados con mayor frecuencia fueron *Penicillium* sp. en el 86% de las muestras (n=50) y *Aspergillus* sp. en un 44% (n=50), los cuales coinciden con los hongos con mayor incidencia reportados en la literatura (Coppeti, 2009; Błajet-Kosicka *et al.*, 2014; Muñoz, 2015; Witaszak *et al.*, 2020; Martínez *et al.*, 2021), en donde se reporta que los contaminantes fúngicos más frecuentes encontrados en el alimento extruido para perros son *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.* y *Rhizopus spp.*; sin embargo, en el presente trabajo se puede observar una mayor incidencia del género *Penicillium* sp y *Aspergillus* sp, además de encontrar la presencia de 9 hongos filamentosos desconocidos, ya que las características macro y microscópicas no coinciden con estructuras morfológicas descritas en la literatura. Diversos autores mencionan que una mayor frecuencia de ambos géneros en el alimento extruido no significa que necesariamente la contaminación fúngica se originó durante la etapa de almacenamiento, ya que estos géneros suelen encontrarse también a nivel de cosecha de los granos; sin embargo, estos hongos no pueden multiplicarse durante el almacenamiento debido a que la materia prima es sometida al proceso de extrusión, pero a pesar de este proceso, las esporas pueden permanecer y colonizar a los granos llegando así a contaminar el alimento.

En una investigación realizada por Witaszak *et al.* (2020) se investigaron 38 muestras de alimentos secos para perros y gatos en empaque sellado disponibles en el mercado polaco (26 muestras para perros y 12 para gatos), de las cuales obtuvieron un 95% de muestras positivas a la contaminación fúngica, lo cual determinaron mediante métodos morfológicos considerando características macro y microscópicas, además de técnicas moleculares para identificar los géneros de hongos presentes en los alimentos analizados, logrando identificar 5 géneros micotoxigénicos, entre los cuales destacan principalmente *Penicillium* sp. (38%) y *Fusarium* sp (33%), así como *Aspergillus* sp. (12%), *Cladosporium* sp. (10%) y *Alternaria* sp. (7%). Błajet-Kosicka *et al.* (2014), determinaron a los principales hongos micotoxigenicos en 49 muestras de alimento comercial seco disponibles en tiendas para mascotas de Polonia (25 muestras para perros y 24 para gatos), de diferentes marcas y lugares de producción, manteniendo las muestras en su empaque original hasta su análisis. Se lograron identificar principalmente a los géneros *Aspergillus* en el 35% de las muestras, *Mucor* en el 10% y *Penicillium* en 8% de las muestras. En lo que respecta a las muestras evaluadas para perros cachorros, el 40% presentó contaminación fúngica, encontrándose un



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



máximo de <10 UFC/g de alimento extruido. En cambio, el 55% de las muestras para perros adultos presentaron contaminación fúngica con un máximo de 20 UFC/g de muestra, lo cual es comparable con las UFC/g de muestra obtenidas en el presente proyecto. Asimismo, Muñoz *et al.* (2015), determinó un 94% de muestras positivas a contaminación fúngica en muestras de alimento extruido para mascotas en empaque (4 muestras para perro y 4 muestras para gato) adquirido en mercados de Venezuela. De las cepas aisladas se identificaron un total de siete géneros fúngicos, encontrándose en mayor proporción a *Aspergillus* sp. (37,14%), *Penicillium* (24,29%), *Fusarium* sp. (17,14%) y *Cladosporium* sp. (11,43%); además, se encontró que en alimentos para cánidos el recuento de colonias fúngicas fue moderado, entre $<1.0 \times 10$ y 1.4×10^3 UFC/g de muestra. Copetti y colaboradores (2009) realizaron un estudio en Brasil en donde analizaron 54 muestras de alimento comercial para mascotas (34 para perros y 20 para gatos), obteniendo como resultado que los hongos estaban presentes en el 74% de las muestras, además de aislar e identificar taxonómicamente a 23 géneros de especies fúngicas en base a las características macro y microscópicas de las colonias, en donde *Aspergillus* sp. y *Aspergillus niger* fueron, respectivamente, los géneros y especies más frecuentemente aislados, seguidos de *Eurotium* sp. y de *Penicillium* sp. En 14 muestras de piensos (8 para perros y 6 para gatos) no se detectó la presencia de hongos en este estudio. Cabe resaltar que en la investigación anteriormente mencionada, también se evaluó la eficiencia de distintos medios de cultivo para la identificación de los hongos a nivel de género empleando y comparando el agar papa y dextrosa (PDA), agar rosa de bengala diclorado y cloranfenicol (DRBC) y agar dicloro glicerol 18% (DG18), determinando que este último presentó los mejores resultados tanto en la cantidad como en la variedad de hongos aislados, en cambio, señalaron que el medio con PDA fue el menos eficaz y no pudo soportar el aislamiento de varios géneros fúngicos, a diferencia del presente proyecto en donde se empleó agar PDA obteniendo una amplia variedad fúngica. La presencia de *Aspergillus spp.* toxigénicos en los cereales u otros ingredientes de los piensos para perros incorporados a las formulaciones del alimento seco comercial deteriora la calidad y afecta a la seguridad de los piensos en su conjunto (Aquino & Correa, 2011).

En lo que respecta a la contaminación de las muestras de los alimentos extruidos analizados, se determinó que el 100% son positivas a la contaminación por OTA; sin embargo, solamente el 12% supera a los límites permisibles establecidos por la Unión Europea, en donde tres de las



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



muestras en empaque sellado (ES07, ES08, ES17) y dos muestras a granel (EG19, EG222) exceden los límites, en cambio una muestra a granel se mantiene en el umbral (EG06). Se determinó mediante el método de ELISA una concentración promedio de 6.2407 ± 4.026 ng/g en las muestras de empaque sellado y de 6.2433 ± 3.536 ng/g en las muestras evaluadas a granel, sin encontrar diferencia significativa, asimismo estas muestras presentaron un intervalo de concentraciones de OTA de 0.5314 ng/g a 20.8687 ng/g en las muestras de empaque sellado y de 1.3262 ng/g a 17.9297 ng/g en las muestras de empaque a granel. Sin embargo, algunos informes de casos han demostrado que la OTA puede inducir insuficiencia renal o incluso la muerte en perros a la concentración de 8.3 ng/g junto con la presencia de citrinina, otra micotoxina, cuyo objetivo principal también es el riñón (Ahn *et al.* 2007).

De igual manera, se evaluaron las concentraciones de OTA obtenidas en las muestras clasificadas como calidad estándar y premium/súper premium y se analizó una clasificación de las muestras en base a la PROFECO, determinando que no hay diferencia significativa entre los grupos de empaque sellado y a granel.

Los intervalos de concentraciones de OTA detectados son similares a los resultados obtenidos por otros estudios en donde se emplearon diversos métodos analíticos para determinar la presencia de micotoxinas en los alimentos; sin embargo, la incidencia de muestras positivas en su totalidad en el presente estudio es mayor en comparación a las investigaciones reportadas, de igual manera el 12% de las muestras de empaque sellado y el 24% de las muestras a granel superan a la concentración reportada por Ahn *et al.*, además de que es importante determinar la presencia de citrinina y su co-ocurrencia con OTA en alimentos extruidos para mascotas con la finalidad de conocer el efecto que ambas pueden estar ocasionando a nivel renal, ya que en el estudio realizado por Shao *et al.* (2018), se menciona que la citrinina fue cuantificada en alimentos para mascotas en el 68.8% de las muestras analizadas con un nivel máximo de 74.3 ng/g.

En una investigación realizada por Yasmina *et al.* (2016), fueron analizadas 20 muestras locales e importadas de alimentos comerciales húmedos y secos para mascotas en Egipto, se estableció que el 70% de las muestras analizadas mediante la técnica de ELISA eran positivas a la presencia de OTA con un intervalo de concentración de 2.62 a 6.65 ng/g. De igual manera, en un estudio realizado por Böhm *et al.* (2010), se evaluó la presencia de las micotoxinas más comunes



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



en 76 muestras de alimento seco para mascotas de diversas marcas adquiridas en mercados, supermercados y tiendas especializadas para mascotas. Para el análisis de estas micotoxinas se empleó la técnica de ELISA, obteniendo como resultado un 5% de muestras positivas a OTA con una concentración promedio de 3.5 ng/g y una concentración máxima de 4.7 ng/g.

Asimismo, se han realizado varias investigaciones utilizando diferentes métodos analíticos para la detección de micotoxinas en alimentos extruidos para mascotas, por ejemplo, en el proyecto de Castaldo *et al.* (2019) en Italia, se analizaron 89 muestras de alimentos secos para mascotas (55 para perros y 34 para gatos) mediante UHPLC-Q-Orbitrap HRMS (cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución), obteniendo un 2.2% de muestras positivas a OTA en un intervalo de 1.4 a 1.5 ng/g. Shao y colaboradores (2018), colectaron 32 muestras de alimentos extruidos para mascotas de diversas marcas colectadas en supermercados de la provincia de China, seleccionando únicamente una muestra por marca de alimento para posteriormente ser analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS), solamente se midió a la OTA en 2 de las 32 muestras con niveles de contaminación de 15.1 y 17.3 ng/g. De igual modo, Błajet-Kosicka *et al.* (2014) determinaron un 46.9% de muestras positivas a OTA en el total de las muestras (perro y gato) mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), con detección de fluorescencia (FLD), con un intervalo de concentración de <0.13 a 3 ng/g, cabe mencionar que de las muestras de perro cachorro el 80% fueron positivas a OTA (4 de 5 muestras) con una media de 0.84 ng/g y un intervalo de <0.13 a 2.23 ng/g; de igual manera, el 45% de las muestras de perro adulto fueron positivas (9 de 20 muestras) con una media de 0.40 ng/g y un intervalo de concentración de <0.13 a 1.14 ng/g.

En el presente estudio se observó que el 100% de las muestras de pacientes analizadas (n=17) fueron positivas a la presencia de OTA en suero sanguíneo. La concentración promedio de OTA en pacientes clínicamente sanos fue de 2.016 ng/mL y de 2.921 ng/mL en pacientes con ERC. De igual manera, el intervalo de concentraciones de OTA en suero fue de 0.974 ng/mL a 2.621 ng/mL y de 0.142 ng/mL a 4.736 ng/mL, respectivamente. Sin embargo, estos valores de concentración de OTA se encuentran por encima de lo reportado en la literatura, además de que no se encuentra diferencia significativa entre ambos grupos (p= 0.0940). Cabe mencionar que el paciente con mayor concentración plasmática de OTA pertenece a los perros con ERC, con 4.736



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



ng/mL (más de dos veces el valor promedio de los pacientes sanos). Meucci *et al.* (2017), reportó elaborar el primer estudio sobre la detección de OTA en muestras de plasma de perros sanos y pacientes caninos con ERC mediante HPLC, encontrando una mayor presencia de OTA en los pacientes nefropáticos; sin embargo, mencionan que aún no es claro si se correlaciona con la progresión de la enfermedad. En esta investigación determinaron la incidencia de OTA en muestras de sangre de perros sanos con un 56% de muestras positivas y perros afectados por enfermedad renal crónica con un 96% y un valor medio con 0.008 ng/mL y 0.144 ng/mL, respectivamente, observando una incidencia y valor medio de OTA en concentraciones plasmáticas significativamente mayor en pacientes con ERC. La mayor concentración plasmática de OTA se observó en un perro con ERC con 1.05 ng/mL (130 veces el valor medio del grupo sano).

En el presente trabajo también se analizaron los cuestionarios sobre la historia clínica para posteriormente realizar correlaciones en los caninos que presentaban ERC, evaluando la concentración de creatinina y urea con respecto a la concentración de OTA en plasma sanguíneo, sin encontrar significancia estadística. Sin embargo, se logró determinar que existe una correlación positiva moderada con respecto a la creatinina ($r= 0.4286$) y en la urea se encontró una correlación positiva baja ($r= 0.3424$), lo cual concuerda con lo reportado por Meucci *et al.* (2017), en donde se menciona que no lograron observar correlaciones significativas entre las concentraciones de OTA y los valores de creatinina y urea de los perros con ERC clasificados en estadios de la enfermedad con base a IRIS.

Los resultados obtenidos por Meucci *et al.*, (2017) muestran que la OTA fue detectada en la mayoría de las muestras de plasma analizadas y sugieren emplear estas concentraciones plasmáticas de OTA como un biomarcador a corto plazo para realizar controles periódicos y reducir la exposición a la OTA resultante de la ingesta dietética de alimentos muy contaminados y de otras fuentes; además de mencionar que se necesitan más estudios sobre los determinantes dietéticos de la ingesta de OTA en animales de compañía y debe explorarse la correlación entre los niveles de OTA y el consumo de alimentos específicos. Con relación a esto, en el presente trabajo fueron examinados los cuestionarios con la historia dietética y frecuencia de ingesta de alimentos en los pacientes caninos sanos y con ERC, observándose que la mayoría de los perros consumen una dieta mixta en donde las croquetas son el alimento principalmente consumido, seguido de otros alimentos derivados de cereales, algunos productos cárnicos y latas comerciales; además de



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



observar que el alimento en empaque sellado es el más empleado para el consumo de las mascotas por más de un año. Se logró observar que al analizar las concentraciones de OTA en perros clínicamente sanos y con ERC con relación al alimento que consumen, se encuentra una correlación positiva moderada ($r= 0.6220$) en pacientes sanos y una correlación positiva alta ($r= 0.7500$) en los caninos con ERC con un nivel de confianza del 94% para ambos, lo cual sugiere que estos alimentos extruidos contaminados pueden ser un factor relacionado con el daño renal en los perros, ya que se encuentran expuestos de manera directa al consumir alimentos derivados de cereales y de forma indirecta al ingerir productos derivados de animales que probablemente están contaminados con OTA.

Es importante seguir empleando métodos analíticos con la finalidad de detectar a la OTA en concentraciones plasmáticas y/o en orina de estos pacientes para evaluar recurrentemente la exposición externa e interna a la OTA resultante de la ingesta alimentaria y de otras fuentes, con la finalidad de implementar estrategias y medidas destinadas a disminuir la exposición a OTA y sus implicaciones en la salud animal, asegurando la biovigilancia de los alimentos y de los caninos que la consumen.



10. CONCLUSIÓN

Los alimentos extruidos para caninos en México se encuentran altamente contaminados por ocratoxina A y hongos ocratoxigénicos, lo cual es un factor ambiental de riesgo para que los perros que consumen frecuentemente estos alimentos tengan cantidades significativas de OTA en sangre pudiendo ocasionar daño renal debido a una exposición prolongada a la micotoxina. Por lo tanto, se cumple parcialmente la hipótesis propuesta para el presente trabajo, ya que el 100% de los alimentos se encuentra contaminado; sin embargo, una minoría de las marcas muestreadas (12%) superan a los niveles permisibles por las normas europeas.



11. PERSPECTIVAS

El presente estudio es uno de los primeros acercamientos en México para evaluar la exposición de OTA en los caninos domésticos a través de los alimentos que consumen, lo cual promueve nuevas propuestas de proyectos para regular la contaminación de alimentos, ya que no se cuentan con normativas mexicanas que establezcan un límite permisible de esta micotoxina en el país. Nuestros resultados indicaron que la totalidad de las muestras de alimentos extruidos y de muestras sanguíneas analizadas resultaron positivas a OTA, sugiriendo que se presenta una contaminación muy marcada desde la cosecha de los granos empleados para la elaboración de alimentos extruidos para mascotas. Por estos motivos, es muy importante la realización de más estudios referentes a la contaminación fúngica de los alimentos por hongos micotoxigénicos, así como la identificación morfológica y molecular de los mismos.

Además, es de suma importancia el empleo de biomarcadores a corto plazo para la detección de la concentración plasmática de OTA en suero sanguíneo y en los alimentos mayormente consumidos mediante métodos analíticos que permitan una mayor sensibilidad de detección para esta micotoxina, así como de la co-ocurrencia de OTA con citrinina, con la finalidad de llevar controles periódicos y poder establecer medidas preventivas que reduzcan el consumo de OTA para poder disminuir los factores relacionados con la enfermedad renal crónica en perros y en otras especies animales.



12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Elhakim, Y. M., El Sharkawy, N. I., & Moustafa, G. G. (2016). An investigation of selected chemical contaminants in commercial pet foods in Egypt. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28: 70-75.
- Águila, R. R. (2015). *Nutrición canina básica: Omisiones y Confusiones vs Hechos Científicos*. Grupo NUTEC. Universidad Nacional Autónoma de México: 1-10
- Ahn, S. J., Jeoung, S. Y., Lim, M. S., Pak, S. I., Han, J. H. & Kim, D. (2007). Canine Renal Failure Caused by Ochratoxin A and Citrinin in the Commercial Dog Food. *Journal of Veterinary Clinics*, 24: 82-87.
- Ali, N., Muñoz, K. & Degen, G. H. (2017). Ochratoxin A and its metabolites in urines of German adults an assessment of variables in biomarker analysis. *Toxicology Letters*, 5: 19-26.
- Aquino, S. & Correa, B. (2011). Aflatoxins in Pet Foods: A risk to special consumers. In *Aflatoxins: Detection, Measurement and Control*. Ed. InTech: 53-74.
- Arrua, A. A., Moura, M. J., Fernández, R. D. & Casal, M. C. (2013). *Aspergillus* y Micotoxinas. *Revista Médica*, 2: 141-164.
- Aryal, S. (2020). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Disponible en: <https://microbenotes.com/enzyme-linked-immunosorbent-assay-elisa/>. Fecha de consulta en septiembre de 2020.
- Bingham, A., Phillips, T. & Bauer, J. (2003). Potencial for dietary protection against the effects of aflatoxins in animals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 222: 591-596.
- Błajet-Kosicka, A., Kosicki, R., Twaru' Z. M. & Grajewski, J. (2014). Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7: 302-308.
- Boermans, H. J. & Leung, M. C. (2007). Mycotoxins and the pet food industry: Toxicological evidence and risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 95-102.
- Böhm, J., Koinig, L., Razzazi-Fazeli, E., Blajetkosicka, A., Twaruzek, M., Grajewski, J. & Lang, C. (2010). Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. *Mycotoxin Research*, 26: 147-153.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Bolet, A. M. & Socarrás, S. M. (2005). Mycotoxins and Cáncer. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 24: 54-59.
- Breitholtz, A., Olsen, M., Dahlback, A. & Hult, K. (1991). Plasma ochratoxin A levels in three Swedish populations surveyed using an ion-pair HPLC technique. *Food Additives & Contaminants*, 8: 183-192.
- Brown, S. (2015). Symmetric dimethylarginine (SDMA): new biomarker of renal function in cats and dogs. International Renal Interest Society. Disponible en: <http://www.iris-kidney.com>. Fecha de consulta en septiembre de 2020.
- Bryden, W. L. (2012). Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security. *Animal Feed Science and Technology*, 173: 134-158.
- Castaldo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Izzo, L., Tolosa, J., Rodríguez, Y. & Ritieni, A. (2019) Target analysis and retrospective screening of multiple mycotoxins in pet food using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Toxins*, 11: 434.
- Castañeda, S. R., Chirivella, M. J. & Carbonell, B. E. (2012). Micotoxicosis derivadas de la nutrición animal; Revisión del tema. *Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación*, 4: 51-61.
- Chacón, A. (2005). Purina corteja a los consumidores. *VenEconomía Mensual*, 22: 1-3.
- Chew, D., Dibartola, S. & Schenck, P. (2011). Fallo renal crónico. *Multimédica Ediciones Veterinarias, Nefrología y urología canina y felina*. Barcelona; Elsevier: 145-196.
- Cigic, I. K. & Prosen, H. (2009). An Overview of Conventional and Emerging Analytical Methods for the Determination of Mycotoxins. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 62-115.
- Colin, V. L., Baigorí, M. D. & Pera, L.M. (2013). Tailoring fungal morphology of *Aspergillus niger* MYA 135 by altering the hyphal morphology and the conidia adhesion capacity: biotechnological applications, *AMB Express*, 3: 27.
- Consejo Nacional de Fabricantes de Alimentos Balanceados y de la Nutrición Animal, A.C. (CONAFAB). (2019). Grupo Amascota: Consumo de alimento para perro y gato. Disponible en: <http://www.conafab.org/membresia/amascota>. Fecha de consulta en septiembre de 2020.
- Consejo Nacional de Población. (2018). Situación actual de las mascotas en México. *Gaceta del Senado*. Disponible en:



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



https://www.senado.gob.mx/64/gaceta_del_senado/documento/86939. Fecha de consulta en junio de 2020.

- Copetti, M. V., Santurio, J. M., Cavalheiro, A. S., Alves, S. H., & Ferreira, L. (2018). Comparison of different culture media for mycological evaluation of commercial pet food. *Acta Scientiae Veterinariae*, 37: 329-335.
- Cortadellas, O. & Fernández-del Palacio, M. J. (2012). Diagnosis and therapy of canine and feline chronic kidney disease (CKD); Part 1: patient evaluation. *Clínica Veterinaria de Pequeños Animales*, 32: 215-223.
- Cortadellas, O. (2010). Estadificación y manejo de la enfermedad renal crónica. En: Cortadellas, O (ed). *Manual de nefrología y urología clínica canina y felina*. Grupo Asís Biomedica SL: 161-177.
- Creppy, E. E., Chakor, K., Fisher, M. J. & Dirheimer, G. (1990). The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and "in vivo". *Archives of Toxicology*, 64: 279-284.
- Cubero, N., Monferrer, A. & Villalta, J. (2002). Aditivos alimentarios. Colección Tecnología de los Alimentos, Ediciones Mundi-Prensa: 240.
- Da Rocha, J. C. (2020). Aditivos Tecnológicos para la Industria Pet food. *International magazine about pet food products*. Disponible en: <https://allextuded.com/entrada/aditivos-tecnologicos-para-la-industria-pet-food-22063>. Fecha de consulta en mayo de 2020.
- Di Bartola, S. P. (2005). Renal Disease: Clinical Approach and Laboratory Evaluation. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. En: Ettinger, S. J., Feldman, E. C. (eds). 6th ed. Saint Louis, Elsevier Saunders: 1716-1730.
- Díaz, V. M. & Rodríguez, C. M. (2019). Las mascotas en el sistema familiar: Legitimidad, formación y dinámicas de las familias humano-animal. *Revista de Psicología*, 18: 44-63.
- Dietrich, D. R., Heussner, A. H. & O'Brien, E. (2005). Ochratoxin A: comparative pharmacokinetics and toxicological implications (experimental and domestic animals and humans). *Food Additives and Contaminants*, 1: 45-52.
- Duarte, S. C., Lino, C. M. & Pena, A. (2010b). Mycotoxin food and feed regulation and the specific case of ochratoxin A: a review of the worldwide status. *Food Additives and Contaminants*, 27: 1440-1450.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Duarte, S. C., Pena, A. & Lino, C. M. (2010a). A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. *Food Microbiology*, 27: 187-198.
- European Commission. (2011). Commission recommendation of 14 January 2011 establishing guidelines for the distinction between feed materials, feed additives, biocidal products and veterinary medicinal products. *Official Journal of the European Union*: 75-79.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2006). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food. *European Food Safety Authority Journal*, 365: 1-56.
- European Food Safety Authority (EFSA). (2020). Scientific Opinion on the risk assessment of ochratoxin A in food. *European Food Safety Authority Journal*, 18: 1-150.
- Food and Drug Administration (FDA). Disponible en: <https://www.fda.gov/animal-veterinary/products/animal-food-feeds>. Fecha de consulta en junio de 2020.
- Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria ELIKA. (2013). Ocratoxina A. Disponible en: <https://www.elika.eus/>. Fecha de consulta en junio de 2020.
- Galtier, P., Alvinerie, M. & Charpentreau, J. L. (1981). The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food and Cosmetics Toxicology*, 19: 735-738.
- Gómez, G. L., Atehortúa, H. C. & Orozco, P. S. (2007). La influencia de las mascotas en la vida humana. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20: 377-386.
- Grandi, M., Vecchiato, C. G., Biagi, G., Zironi, E., Tondo, M. T., Pagliuca, G., Palmonari, A., Pinna, C., Zaghini, G., & Gazzotti, T. (2019). Occurrence of Mycotoxins in Extruded Commercial Cat Food. *American Chemical Society, Omega*, 4: 14004-14012.
- Hagelberg, S., Hult, K. & Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology*, 9: 91-96.
- Hall, J. A., Yerramill, M., Obare, E., Almes, K. & Jewell, D. E. (2016). Serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine in dogs with naturally occurring chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 30: 794-802.
- Han, Z., Tangni, E. K., Di Mavungu, J. D., Vanhaecke, L., De Saeger, S., Wu, A. & Callebaut, A. (2013b). In vitro glucuronidation of ochratoxin A by rat liver microsomes. *Toxins*, 5: 2671-2685.
- Han, Z., Zhao, Z., Shi, J., Liao, Y., Zhao, Z., Zhang, D., Wu, Y., De Saeger, S. & Wu, A.



- (2013a). Combinatorial approach of LC-MS/MS and LC-TOF-MS for uncovering in vivo kinetics and biotransformation of ochratoxin A in rat. *Journal of Chromatography*, 925: 46-53.
- Heine, R. & Lefebvre, H. (2007). Assessment of renal function. En: Elliot, J., Grauer, F. (eds). *Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology*. Gloucester, British Small Animal Veterinary Association: 117-125.
 - Heussner, A. H. & Bingle, L. E. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: a review of the available data. *Toxins*, 7: 4253-4282.
 - IDEXX. (2015). Resumen técnico SDMA. Disponible en: www.idexx.es. Fecha de consulta en septiembre del 2020.
 - Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2018). Situación actual de las mascotas en México. Disponible en: https://www.senado.gob.mx/64/gaceta_del_senado/documento/86939. Fecha de consulta en junio de 2020.
 - Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2021). Encuesta Nacional de Bienestar Autorreportado (ENBIARE). Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/programas/enbiare/2021/>. Fecha de consulta en marzo de 2022.
 - Jaramillo, A. (2017a). ¿Cómo se distribuye el consumo de mascotas en México?. Estudio de Mascotas 2017, Departamento de investigación Revista Merca 2.0. Disponible en: <https://www.merca20.com/como-se-distribuye-el-consumo-de-mascotas-en-mexico/>. Fecha de consulta en junio de 2020.
 - Jaramillo, A. (2017b). ¿Cómo se reparte el consumo de comida para perros en México?. Estudio de Mascotas 2017, Departamento de investigación Revista Merca 2.0. Disponible en: <https://www.merca20.com/como-se-reparte-el-consumo-de-comida-para-mascotas-en-mexico/>. Fecha de consulta en junio de 2020.
 - Kamp, H. G., Eisenbrand, G., Janzowski, C., Kiossev, J., Latendresse, J. R., Schlatter, J. & Turesky, R. J. (2005). Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49: 1160-1167.
 - Kaushik, G. (2013). Effect of processing on mycotoxin content in grains. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55: 1672-1683.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Koeppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. & Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: Current state of analytical methods and limitations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1595-1612.
- Kőszegi, T. & Poor, M. (2016). Ochratoxin A: Molecular interactions, mechanisms of toxicity and prevention at the molecular level. *Toxins*, 8: 111.
- Krska, R. & Molinelli, A. (2007). Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 145-148.
- Kuiper-Goodman, T. & Scott, P. M. (1989). Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2: 179-248.
- Kumagai, S. (1985). Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food and Chemical Toxicology*, 23: 941-943.
- Limonciel, A. & Jennings, P. (2014). A review of the evidence that ochratoxin A is an Nrf2 inhibitor: implications for nephrotoxicity and renal carcinogenicity. *Toxins*, 6: 371-379.
- López de Cerain, A., Jimenéz, A. M., Ezpeleta, O. & Bello, J. (2000). Efectos tóxicos de la Ocratoxina. *Revista Toxicología*, 17: 61-69.
- Maia, P. & Pereira, M. (2002). Ocurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in some Brazilian pet foods. *Food Additives and Contaminants*, 19: 1180-1183.
- Malir, F., Osrty, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J. & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, 8: 191.
- Martínez, M. L., Valdivia F. A. G., Guerrero B. A. L., Quezada T. T., Rangel M. E. J. & Ortiz M. R. (2021). Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review. *Toxins*, 13: 65.
- Martínez, M. L., Valdivia, F. A., Guerrero, B. A., Quezada, T. T., Rangel, M. E. & Ortiz, M. R. (2021). Toxic Effect of Aflatoxins in Dogs Fed Contaminated Commercial Dry Feed: A Review. *Toxins*, 13: 65.
- Martínez, T. C. & Chaves, S. D. (2019). Ochratoxins and their nephrotoxic potential. *Revista de Nefrología, Dialisis y Trasplante*, 39: 74-82.
- Meucci, V., Luci, G., Vanni, M., Guidi, G., Perondi, F. & Intorre, L. (2017). Serum levels of ochratoxin A in dogs with chronic kidney disease (CKD): a retrospective study. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79: 440-447.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2015). Recomendaciones para la prevención, el control y la vigilancia de las micotoxinas en las fábricas de harinas y sémolas. Disponible en: <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/publicaciones>. Fecha de consulta en julio de 2020.
- Miraglia, M., Brera, C. & Colastosti, M. (1996). Application of biomarkers to assessment of risk to human health from exposure to mycotoxins. *Microchemical Journal*, 54: 472-477.
- Motta, E. (2009). Tesis Estimación de la exposición a micotoxinas a través de dos técnicas: ocratoxina A en plasma y biodisponibilidad de fumonisina B1 en copos de maíz. Universidad de Buenos Aires.
- Muñoz, D. J., Rodríguez, R., Mota, J. J., & Suarez, L. R. (2015). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos en alimentos concentrados para mascotas domésticas (perros y gatos). *Revista Científica*, 25: 432-438.
- Ngundi, M. M., Shriver, L. C., Moore, M. H., Lassman, M. E., Ligler, F. S. & Taitt, C. R. (2005). Array biosensor for detection of ochratoxin A in cereals and beverages. *Analytical Chemistry*, 77: 148-154.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-111-SSA1-1994. Bienes y Servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Disponible en: <http://www.economia-noms.gob.mx/normas/noms/1995/111-ssa1.pdf>. Fecha de consulta en abril de 2021.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-130-SSA1-1995. Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/130ssa15.html>. Fecha de consulta en mayo de 2021.
- Omar, R. F., Gelboin, H. V. & Rahimtula, A. D. (1996). Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochemical Pharmacology*, 51: 207-216.
- Papagianni, M. (2007). Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 25: 244-263.
- Pereira, C. C., Cunha, S. & Fernandes, J. O. (2019). Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*, 11: 290.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Perrone, G. & Susca, A. (2017). *Penicillium* Species and Their Associated Mycotoxins. *Methods in Molecular Biology*, 1542: 107-119.
- Perry, J. L., Christensen, T., Goldsmith, M. R., Toone, E. J., Beratan, D. N. & Simon, J. D. (2003). Binding of ochratoxin A to human serum albumin stabilized by a protein-ligand ion pair. *Journal of Physical Chemistry*, 107: 7884-7888.
- Perusia, O. R. & Rodríguez, A. R. (2001). Micotoxicosis. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 12: 87-116.
- Polzin, D. J. (2011). Chronic Kidney Disease. In: *Nephrology and Urology of Small Animals*. Bargtes, J. & Polzin, D. J. (eds.), Wiley-Blackwell: 433-471.
- Procuraduría Federal del Consumidor (POFECO). (2016). Laboratorio PROFECO; Alimentos para perros. *Revista del consumidor*. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/110359/RC467_045-OK.pdf. Revisado en abril de 2021.
- Puschner, B. (2002). Mycotoxins. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 32: 409-419.
- Raghubeer, S., Nagiah, S. & Chuturgoon, A. A. (2007). Acute Ochratoxin A exposure induces inflammation and apoptosis in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Toxicon*, 137: 48-53.
- Ravelo, A., Rubio, C., Gutiérrez, A. J. & Hardisson, A. (2011). La Ocratoxina A en alimentos de consumo humano. *Nutrición Hospitalaria*, 26: 1215-1226.
- Razzazi-Fazeli, E., Böhm, J., Grajewski, J., Szczepaniak, K., Kübber-Heiss, A. J. & Iben, C. H. (2001). Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85: 212-216.
- Recomendación (UE) 2016/1319 de la Comisión de 29 de julio de 2016 que modifica la Recomendación 2006/576/CE por lo que se refiere al deoxinivalenol, la zearalenona y la ocratoxina A en los alimentos para animales de compañía. *Diario Oficial de la Unión Europea*. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2016/208/L00058-00060.pdf>. Fecha de consulta en enero de 2020.
- Reglamento (CEE) nº 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



alimenticios. Disponible en: [https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1993-80158#:~:text=Reglamento%20\(CEE\)%20n%C3%BAm.,presentes%20en%20los%20productos%20alimenticios](https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-1993-80158#:~:text=Reglamento%20(CEE)%20n%C3%BAm.,presentes%20en%20los%20productos%20alimenticios). Fecha de consulta en julio de 2020.

- Requena, F., Saume, E. & León, A. (2005). Micotoxinas: riesgos y prevención. *Zootecnia Tropical*, 23: 393-410.
- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicosis: an overview. *International Journal of Food Microbiology*, 119: 3-10.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J. & Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159: 18-46.
- Rodríguez, I. B., Johnson, R. J. & Herrera, A. J. (2005). Tubulointerstitial damage and progression of renal failure. *Kidney International Supplements*, 99: 82-6.
- Santibañez, R. E., Hernández, M. G., Montañez, O. V., Tapia, J. G., Martínez, J. I. & Avellaneda, J. C. (2011). Identificación y cuantificación de hongos micotoxicogénicos en alimentos para bovinos. *Ciencias Tecnológicas*, 4: 19-23.
- Serpell, J. A. (2016). History of companion animals and the companion animal sector. *Companion Animal Ethics*. John Wiley & Sons, 1: 8-23.
- Serrano, C. H. & Cardona, C. N. (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *CES Medicina*, 29: 143-151.
- Shao, M., Li, L., Gu, Z., Yao, M., Xu, D. & Fan, W. (2018). Mycotoxins in commercial dry pet food in China. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 11: 237-245.
- Sharma, M. & Marquez, C. (2001). Determination of aflatoxins in domestic pet foods (dog and cat) using immunoaffinity column and HPLC. *Animal Feed Science and Technology*, 93: 109-114.
- Shurson, G. C. (2018). Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology*, 235: 60-76.
- Songsermsakul, P., Razzazi-Fazeli, E., Böhm, J. & Zentek, J. (2007). Occurrence of deoxynivalenol (DON) and ochratoxin A (OTA) in dog foods. *Mycotoxin Research*, 23: 65-67.
- Soriano del Castillo, J. (2015). *Micotoxinas en alimentos*. España: Diaz de Santos.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Steinbrück, D., Rasch, C. & Kumke, M. U. (2008). Photophysics of ochratoxin A in aqueous solution. *Zeitschrift für Naturforschung*, 63: 1321-1326.
- Studer, R. I., Schlatter, J. & Dietrich, D. R. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology*, 74: 499-510.
- Szczech, G. M., Carlton, W. W. & Tuite, J. (1973a). Ochratoxicosis in Beagle dogs I; Clinical and clinicopathological features. *Veterinary Pathology*, 10: 135-154.
- Szczech, G. M., Carlton, W. W. & Tuite, J. (1973b). Ochratoxicosis in Beagle dogs II; Pathology. *Veterinary Pathology*, 10: 219-231.
- Turner, N. W., Subrahmanyam, S., Piletsky, S. A. (2009). Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica Acta*, 632: 168-180.
- Twomey, L. N., Pethick, D. W., Rowe, J. B., Choct, M., Pluske, J. R., Brown, W. & Laviste, M. C. (2002). The use of sorghum and corn as alternatives to rice in dog foods. *Journal of Nutrition*, 132: 1704-1705.
- Urusov, A. E., Zherdev, A. V. & Dzantiev, B. B. (2010). Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46: 253-266.
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, B., & Theron, J. J. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by “*Aspergillus ochraceus*” Wilh. *Nature*, 205: 1112-1113.
- Vasanthi, S. & Bhat, R. V. (1998). Mycotoxins in foods-occurrence, health and economic significance and food control measures. *Indian Journal of Medical Research*, 108-212.
- Wheeler, K. A., Hurdman, B. F. & Pitt, J. I. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*, 12: 141-149.
- Witaszak, N., Stepień, T., Bocianowski, J. & Waśkiewicz, A. (2020). *Fusarium* Species and Mycotoxins Contaminating Veterinary Diets for Dogs and Cats. *Microorganisms*, 7: 26.
- Wu, Q. H., Dohnal, V., Huang, L. L., Kuca, K., Wang, X., Chen, G. Y. & Yuan, Z. H. (2011). Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current Drug Metabolism*, 12: 1-10.
- Yerramilli, M., Farace, G., & Quinn, J. (2016). Kidney disease and the nexus of chronic kidney disease and acute kidney injury: The role of novel biomarkers as early and accurate diagnostics. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 46: 961-993.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Zhao, T., Shen, X. L., Chen, W., Liao, X., Yang, J., Wang, Y., Zou, Y. & Fang, C. (2017). Advances in research of nephrotoxicity and toxic antagonism of ochratoxin A. *Toxin Reviews*, 36: 39-44.
- Zheng, M. Z., Richard, J. L. & Binder, J. (2006). A Review of Rapid Methods for the Analysis of Mycotoxins. *Mycopathologia*, 161: 261-273.
- Zwierzchowski, W., Gajecki, M., Obremski, K., Zielonka, L. & Baranowski, M. (2004). The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 7: 289-293.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



13. ANEXOS

13.1 Carta de consentimiento informado



Fecha: ____ / ____ / ____

Título del estudio: Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación.

Estimado propietario, usted ha sido invitado a participar en el presente estudio de investigación, el cual, es desarrollado en la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”. Su colaboración es de carácter voluntario, por lo tanto, usted es libre de decidir como propietario la participación de su mascota sin que esto provoque inconveniente alguno en la atención médica del mismo. En caso de que su decisión sea positiva, será necesario que considere la siguiente información.

¿Cuál es la finalidad del estudio? Determinar la concentración plasmática de OTA en perros que consuman alimentos extruidos comerciales.

¿Cómo será el procedimiento a realizar? Una vez firmada la Carta de Consentimiento Informado, su participación como propietario será contestar algunas preguntas relacionadas con la historia clínica de su mascota y otro cuestionario sobre nutrición y alimentación. Después, se preparará a su mascota para la extracción de 2.5 mL de sangre a través de la punción con material estéril y desechable para posteriormente determinar la concentración de OTA en plasma.

¿Cuáles son los riesgos asociados con el estudio? El presente estudio no supone peligro alguno para la integridad de los pacientes caninos a muestrear. Sin embargo, es posible que su mascota presente un ligero dolor, morete o sangrado en la zona de punción.

¿Cuándo se me podrá informar acerca de los resultados de mi mascota? Se darán a conocer los resultados a finales del 2021. Estos serán difundidos y publicados con fines científicos y no será expuesta su identidad ni la de su mascota.

Yo _____ propietario de mi mascota de nombre _____ manifiesto que he leído y comprendido esta carta de consentimiento informado y se han aclarado satisfactoriamente mis dudas. Apruebo que mi mascota participe en este estudio de investigación y así mismo, otorgo mi autorización para que la información proporcionada sea empleada para su publicación o difusión con fines científicos. Recibiré una copia firmada y fechada de esta carta de consentimiento.

Nombre y firma del propietario

MVZ. Zaira Vianey Aguado Andrade

Nombre y firma de testigo

Contacto: MVZ Zaira Vianey Aguado Andrade; Tel. celular: (443) 3611593; Correo electrónico: 1026500d@umich.mx. Profesor-investigador titular: D. en C. Virginia Angélica Robinson Fuentes; Correo electrónico: vrobinsonf@umich.mx; Tel. fijo: (443) 3120014 con extensión #235.



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



13.2 Cuestionario de la historia clínica del paciente

Datos Generales.



N° Historia Clínica:		
Fecha y hora de admisión: ___/___/___ ___:___ am / pm		
Nombre del Paciente:		
Nombre de la Clínica Veterinaria:		
MVZ encargado:		
Propietario:	Teléfono/Celular:	
	Ocupación:	
Dirección:	Ciudad o municipio:	
	Email:	

Reseña del paciente canino.

Raza:	Sexo:	Edad:
Color y señas particulares:		

Historia clínica.

Vacunación: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Última vacuna y fecha:	Desparasitación: <input type="checkbox"/> Si <input type="checkbox"/> No Producto aplicado y fecha:	Dieta: <input type="checkbox"/> Croquetas <input type="checkbox"/> Casera <input type="checkbox"/> Mixta Otra: _____
Lugar de origen o procedencia: <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Urbana	Hábitat: <input type="checkbox"/> Interior <input type="checkbox"/> Exterior Otro: _____	Marca más frecuente de croquetas: <input type="checkbox"/> Dog Chow <input type="checkbox"/> Perron <input type="checkbox"/> Pedigree <input type="checkbox"/> Royal Canin <input type="checkbox"/> Hill's <input type="checkbox"/> Nupec Otra: _____
Actividad física: <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderada <input type="checkbox"/> Frecuente		



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



Estado Reproductivo: <input type="checkbox"/> Esterilizado <input type="checkbox"/> Entero <input type="checkbox"/> Gestación <input type="checkbox"/> Lactancia Fecha de último celo: ____/____/____		Alergias:
		Cirugías:
Padecimientos anteriores:	Antecedentes familiares:	

Examen Físico.

FC: ____ lpm	FR: ____ rpm	Mucosas:
T°: ____	Pulso: ____	<input type="checkbox"/> Rosadas <input type="checkbox"/> Rojas <input type="checkbox"/> Pálidas <input type="checkbox"/> Cianóticas <input type="checkbox"/>
TLC: ____ s	Peso: ____ kg	Ictéricas
Turgencia piel: ____		
Estado Nutricional:		
<input type="checkbox"/> Caquéxico <input type="checkbox"/> Emaciado <input type="checkbox"/> Bajo de Peso <input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Sobrepeso <input type="checkbox"/> Obesidad		

Anamnesis:

Diagnóstico:

Pruebas Complementarias:

Tratamiento y Evolución del Paciente:



13.3 Cuestionario de nutrición y alimentación de caninos domésticos

Nº Historia Clínica:
Nombre del Paciente:
Nombre del Propietario:

Instrucciones: Rellene la casilla con la(s) respuesta(s) correspondiente(s).

1. Tipo de alimentación en que se basa la dieta de su mascota:

- | | |
|--|-------------------------|
| <input type="checkbox"/> Croqueta/pellet | Cantidad por día: _____ |
| <input type="checkbox"/> Alimento casero | Cantidad por día: _____ |
| <input type="checkbox"/> Lata comercial o sobre | Cantidad por día: _____ |
| <input type="checkbox"/> Dieta BARF | Cantidad por día: _____ |
| Agua, <input type="checkbox"/> Garrafón <input type="checkbox"/> Grifo | Cantidad por día: _____ |

2. Frecuencia de consumo por semana de los siguientes alimentos:

- | | | | | |
|-----------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Croqueta/pellet | <input type="checkbox"/> Nunca | <input type="checkbox"/> 1 vez | <input type="checkbox"/> 2-4 veces | <input type="checkbox"/> 4-7 veces |
| Alimento casero | <input type="checkbox"/> Nunca | <input type="checkbox"/> 1 vez | <input type="checkbox"/> 2-4 veces | <input type="checkbox"/> 4-7 veces |
| Lata | <input type="checkbox"/> Nunca | <input type="checkbox"/> 1 vez | <input type="checkbox"/> 2-4 veces | <input type="checkbox"/> 4-7 veces |
| Dieta BARF | <input type="checkbox"/> Nunca | <input type="checkbox"/> 1 vez | <input type="checkbox"/> 2-4 veces | <input type="checkbox"/> 4-7 veces |

3. ¿Durante cuánto tiempo su mascota ha sido alimentada con este producto?

- < 6 meses 6 meses > 1 año

4. ¿Cuál es la marca preferida para el alimento extruido consumido por su mascota?

- | | | |
|-----------------------------------|--------------------------------------|---|
| <input type="checkbox"/> Dog Chow | <input type="checkbox"/> KIRKLAND | <input type="checkbox"/> Pro Plan |
| <input type="checkbox"/> Pedigree | <input type="checkbox"/> Royal Canin | <input type="checkbox"/> Diamond |
| <input type="checkbox"/> Beneful | <input type="checkbox"/> Hill's | <input type="checkbox"/> Nature's Variety |
| <input type="checkbox"/> Ganador | <input type="checkbox"/> Nupec | Instict |
| <input type="checkbox"/> Perron | <input type="checkbox"/> Eukanuba | <input type="checkbox"/> Otro _____ |

5. Motivo por el cuál prefiere la marca seleccionada.

- | | | |
|----------------------------------|--|--|
| <input type="checkbox"/> Calidad | <input type="checkbox"/> Nutrición | <input type="checkbox"/> Recomendación |
| <input type="checkbox"/> Precio | <input type="checkbox"/> Palatabilidad | <input type="checkbox"/> Otro _____ |

6. ¿En qué lugar se compra el producto?



“Exposición de caninos domésticos (*Canis lupus familiaris*) a ocratoxina A a través de su alimentación”



- Tienda de abarrotes Supermercado Clínica veterinaria

7. ¿En qué presentación adquiere el producto?

- Granel Empaquetado

8. En caso de emplear alimentos caseros, mencione la frecuencia de consumo a la semana de las siguientes opciones:

• Carnes y embutidos

Jamón	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Salchicha	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Carne de pollo	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Carne de res	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Carne de cerdo	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Atún	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Menudencias de pollo	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces

• Cereales

Tortilla de maíz	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Pan dulce	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Pan de caja	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Bolillo o telera	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Arroz	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces

• Verduras

Jitomate	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Zanahoria	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Papas cocidas	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces

• Condimentos

Sal	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Sazonador (caldo de pollo)	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Pimienta negra	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Ajo	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces
Cebolla	<input type="checkbox"/> Nunca	<input type="checkbox"/> 1 vez	<input type="checkbox"/> 2-4 veces	<input type="checkbox"/> 4-7 veces

9. ¿Proporciona las carnes cocidas? Sí No