

Deoxinivalenol: métodos de análisis de residualidad en cereales. Toxicidad en animales de granjas

Deoxinivalenol: Methods for residue analysis in cereals. Toxicity in farm animals

Dayana Sosa^{1✉}, A. Escobar¹, R. Faure²

¹*Centro de Ensayos para el Control de la Calidad de los Alimentos (CENLAC). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.*

²*Grupo de Desarrollo Biofarmacéutico. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.*

RESUMEN: A nivel mundial, los cereales constituyen la base de la alimentación de las personas y los animales, de ahí que cada vez más se fomente el auge de su producción. Actualmente, Cuba importa gran cantidad de cereales procedentes de Europa y América, con una inversión ascendente a 240 millones de dólares en el año 2012. Con frecuencia, los cereales pueden estar contaminados con micotoxinas, entre las que se encuentra el deoxinivalenol (DON). Este puede dañar la salud animal: por reducción en el consumo de alimento y en la ganancia en peso, alteración del sistema inmune, entre otros efectos adversos. Por estas razones muchos países han implementado políticas de monitoreo de residuos y contaminantes para garantizar la inocuidad de los alimentos que exportan, producen e importan. Para ello aplican límites máximos permisibles (LMPs) establecidos por organizaciones internacionales que varían en dependencia del tipo de cereal, del destino y de la propia entidad regulatoria. Aun así, en los últimos años se han reportado numerosos casos de contaminación de cereales por DON y sus conjugados con concentraciones de 4374.4 y 2990 μgkg^{-1} en maíz y 2352 μgkg^{-1} en pienso, en países como China, Suiza y Sudáfrica, respectivamente. En Cuba se ha detectado el DON en cereales, como el trigo, con concentraciones por encima de 1000 μgkg^{-1} . Para la cuantificación de esta micotoxina existen varios métodos analíticos; entre los más empleados están la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y su acople a Espectrometría de Masa (CLAR/MS). Esta revisión tiene como objetivo brindar información sobre las metodologías aplicadas en el análisis del DON en cereales y la toxicidad que ocasiona esta micotoxina en animales de granja. Se expresa como conclusión general que este tricoteceno afecta la salud, reflejada en la disminución de los índices productivos, y se cuenta con varias metodologías analíticas que permiten su determinación y las regulaciones que establecen LMP para proteger la salud animal.

Palabras clave: deoxinivalenol, residuos, toxicidad, métodos analíticos, cereales, animales de granja.

ABSTRACT: Cereals are the staple food of persons and animals worldwide, hence their production increases every year. Cuba currently imports large quantities of cereals from Europe and America, with an investment of up to 240 million dollars in 2012. Often, cereals may be

✉ Autores para correspondencia: Dayana Sosa y A. Escobar. E-mail: dayana@censa.edu.cu, escobar@censa.edu.cu

Recibido: 15-9-2016

Aceptado: 20-5-2017

contaminated with mycotoxins, including deoxynivalenol (DON). This can damage animal health, reduce food consumption and gain weight, and alter the immune system, among other adverse effects, forcing countries to implement policies to monitor waste and contaminants to ensure the safety of the foods produced, exported and imported. For this purpose, they apply maximum permissible limits (MPL), established by international organizations that vary depending on the type of cereal, destination and the regulatory entity itself. However, in recent years, there have been numerous reports of grain contamination by DON and its conjugates, with concentrations of 4374.4 and 2990 μgkg^{-1} in maize and 2352 μg^{-1} in feed, in countries such as China, Switzerland and South Africa, respectively. In Cuba, concentrations over 1000 μgkg^{-1} have been detected in grains like wheat. For the quantification of this mycotoxin there are several analytical methods. Among the most used are the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and its coupling to Mass Spectrometry (HPLC/MS). This review is aimed at providing information on the methodologies applied in the analysis of DON in cereals and the toxicity caused by this mycotoxin in farm animals. It is expressed as a general conclusion that this trichothecene affects health, reflected in the decrease of productive indexes; and has several analytical methodologies that allow its determination and the regulations established by the MPL to protect animal health.

Keywords: deoxynivalenol, residues, toxicity, analytical methods, cereals, farm animals.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, la producción de alimentos constituye la prioridad fundamental para garantizar la seguridad alimentaria de las poblaciones (1). Los cereales representan el reglón básico de la alimentación humana y animal; sus principales productores son los países en desarrollo (2). Cuba importa cereales de países europeos y americanos, la inversión que se realiza ascendió a 240 millones de dólares en el año 2012 (3).

Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos de origen micótico, que pueden aparecer como contaminantes naturales en los alimentos (4). Los cereales son sustratos propensos al crecimiento de los hongos y, por tanto, suelen estar contaminados con sus toxinas. Entre las principales micotoxinas se encuentran: las aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumonisinas y los alcaloides ergóticos (5). Los tricotecenos se dividen en cuatro grupos (A-D), de acuerdo a las características de sus grupos químicos funcionales (6). La micotoxina que con más frecuencia se detecta de los tricotecenos es el deoxinivalenol (DON) (Figura 1), muy conocido por el nombre de vomitoxina; es un

tricoteceno tipo B, un epoxi-sesquiterpenoide, con un peso molecular de 296.3 gmol^{-1} (7). Se asocia a dos especies de hongos del género *Fusarium*: *F. graminearum* (*Gibberellazeae*) y *F. culmorum* (8). La primera es responsable de la podredumbre de las mazorcas y fusariosis del trigo y la cebada en climas templados como en América del Norte, China y Europa; la segunda abunda en climas de templados a fríos, como los del oriente de Australia, el norte de los Estados Unidos, Canadá y Europa. *F. graminearum* crece, de manera óptima, a temperatura de 25 °C y una actividad de agua (a_w) de 0.88; *F. culmorum* lo realiza a temperatura de 21 °C y una a_w de 0.87 (5).

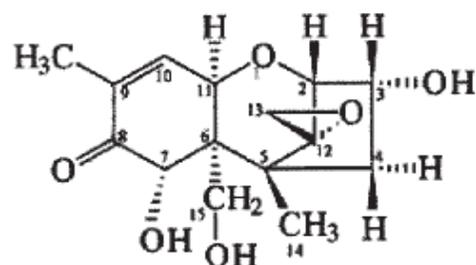


FIGURA 1. Estructura química del deoxinivalenol./Chemical structure of deoxynivalenol.

Se ha descrito que el DON puede causar toxicidad aguda y crónica. En animales, tanto de laboratorio como domésticos, las altas dosis de DON producen rechazo del alimento, disminución del peso corporal, alteraciones inmunológicas, vómitos, irritación dérmica y gastrointestinal (9); a bajas concentraciones en la dieta ocasiona anorexia y reduce el crecimiento (10).

Se informan altas concentraciones de DON en maíz, avena, cebada y trigo; mientras que los niveles más bajos, generalmente, están asociados a centeno, sorgo, arroz y triticale (cruza de trigo y centeno) (6). Estas son las principales fuentes de contaminación alimentaria del DON (11). Los tricotecenos se presentan en los alimentos como una mezcla de toxinas, con diferentes grados de toxicidad y, sobre todo, en distintas concentraciones. Entre las organizaciones reguladoras que han establecido LMPs en los cereales para garantizar la inocuidad alimentaria se encuentran la Unión Europea (UE), *Codex Alimentarius* y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, de sus siglas en inglés). Los LMPs varían en dependencia de la entidad reguladora, el tipo de cereal y la población de individuos que consumen el alimento, y son más estrictos sobre todo cuando se trata del humano (12,13). Para la determinación de DON en cereales se disponen de diversos métodos analíticos: a) los cromatográficos, que están integrados por la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) (14), la Cromatografía Gaseosa (CG) (15), ambas acopladas a MS y la Cromatografía de Placa Delgada (PC) (16); b) ensayos inmunoenzimáticos y tecnologías novedosas rápidas que incluyen la inmunocromatografía, la polarización fluorescente y los biosensores (17). Dentro de los métodos oficiales descritos por la Asociación Oficial de Análisis Químico (AOAC, en sus siglas en inglés) se hallan la PC y la CG; sin embargo, existen numerosos reportes de la validación de los métodos previamente mencionados, donde el más

utilizado es la CLAR acoplado o no a MS. Esta revisión tiene como objetivo brindar información sobre las metodologías aplicadas para el análisis del DON en cereales y la toxicidad que ocasiona esta micotoxina en animales de granja.

MÉTODOS ANALÍTICOS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL EN CEREALES

Los tricotecenos naturales pueden dividirse en sustancias polares por la presencia de un grupo cetó C₈ (tricotecenos tipo B), y las menos polares debido a la carencia de este grupo funcional y la escasa presencia de grupos hidroxilos libres (5). Por eso, los procedimientos analíticos difieren en cuanto a la extracción, la purificación, la detección y la cuantificación (18). Por tanto, para el análisis del DON es necesario realizar las tres etapas antes mencionadas, las cuales van a variar en dependencia del método aplicado y el tipo de alimento procesado. Dada la relativa polaridad del DON, la extracción se lleva a cabo, fundamentalmente, con acetonitrilo o metanol acuoso (18); de esta manera el extracto obtenido con el acetonitrilo acuoso resulta mucho más limpio.

Mientras que los inmunoensayos, generalmente, no requieren la realización de la purificación del extracto, los métodos físico-químicos desarrollan esta etapa con procedimientos extensivos, donde la extracción en fase sólida (SPE), la purificación mediante columnas multifuncionales (ej: columnas MycoSep®) y las columnas de inmunoafinidad (CIAs) son las que más se emplean en la purificación de los extractos de cereales crudos y procesados. Las columnas de SPE han sustituido a las convencionales empaquetadas con los mismos rellenos, como son la sílica gel, el óxido de aluminio, el florisil, el carbón activado y la fase reversa C₈ o C₁₈ en correspondencia con el rango de polaridad del absorbente (5), pero la más frecuente que se usa para DON es aquella

contentiva de la mezcla de carbón activado, alumina y celite (16). Las columnas MycoSep® son una de las más aplicadas y de mayor disponibilidad en el mercado, que ofrecen un extracto limpio y se han empleado en la purificación rápida, de manera simultánea, de tricotecenos de tipo A y B. Por otra parte, las CIAs proveen extractos muy limpios con respecto a otros métodos, debido a la especificidad de los anticuerpos, los cuales pueden ser monoclonales o policlonales y se encuentran comercialmente disponibles para el DON, la toxina T-2 y HT-2 y otras micotoxinas (19). Sin embargo, se informa que las purificaciones realizadas mediante SPE y MycoSep® resultan más eficientes que las realizadas con CIAs, con valores de recobrados de 97.6, 92.7 y 73.8 %, respectivamente (20).

Recientemente, se ha incrementado el interés en la aplicación de polímeros impresos molecularmente (PIMs) como absorbente en la SPE por su bajo costo, fácil preparación, elevada estabilidad química y durabilidad. Estos polímeros son capaces de ligarse al analito y proveer elementos de reconocimiento bioimitantes capaces de fijarlo de manera selectiva con una eficiencia comparable a la interacción antígeno-anticuerpo (21). Otra metodología la constituyen los QuEChERS, que se caracterizan por la extracción rápida, confiable, fácil, económica, robusta y segura de los analitos a partir de matrices complejas; se utilizan ampliamente en la extracción de agrotóxicos y se adaptan al análisis de las micotoxinas. En el caso del DON se ha aplicado en arroz (22), cereales para el desayuno, harinas (23) y cebada (24). El empleo de los QuEChERS ha brindado buenos resultados en los parámetros del desempeño; un ejemplo de ello proviene de comparar la extracción líquido-líquido realizada con acetonitrilo: agua y los QuEChERS en la determinación de DON en arroz (22), cuyos RSD_r fueron de 5.1 y 2.4 %, la precisión intermedia de 16.8 y 15.4 % y la recuperación de 75 y 91 %, respectivamente. Similares

resultados se observaron en el caso de la cebada al comparar esta última técnica con otras y confirmarse que es más rápida y sencilla (24).

Existen muchos métodos analíticos para la determinación del DON en cereales, entre los que se encuentran los cromatográficos e inmunoenzimáticos (Figura 2) y, dentro de estos, las técnicas que con mayor frecuencia se utilizan son las cromatografías gaseosa y líquida (20), principalmente esta última acoplada a MS. Estos métodos también pueden clasificarse como de pesquisajes y confirmatorios. En el primer grupo se encuentran las técnicas de CP y ELISA. La CP es el método oficial propuesto por la AOAC. El límite de detección típico del DON en esta técnica es de 20-300 ngg⁻¹. El ELISA ha sido desarrollado como método de pesquizaje y cuantificación de los tricotecenos en alimentos, pero en matrices simples, como los cereales, pueden utilizarse ambos. Los ELISAs son selectivos, sensibles, rápidos y fáciles de usar; sin embargo, la producción de anticuerpos eficaces para la determinación de los tricotecenos es difícil y compleja. Con estos fines se han desarrollado ELISAs que emplean anticuerpos policlonales o monoclonales en ensayos competitivos directo e indirecto. En estas se ha introducido la purificación por columnas (ej: MultiSep # 226) con buenos resultados. Estas ventajas se reflejaron en los análisis del DON en arroz y maíz ensilado, donde se redujo su sobreestimación por la influencia de reacciones cruzadas con la matriz (25). Con relación a su sensibilidad puede reflejarse que ha presentado valores desde 20-300 ngg⁻¹ en la determinación directa del DON, donde ha sido mucho menor para el 3-acetilDON, en el que se reportan valores de 0.3-1 ngg⁻¹. Sin embargo, esta técnica presenta la desventaja que la cuantificación del analito está limitada por la existencia de reacciones cruzadas (26). No obstante, los ELISAs constituyen una alternativa cuando los instrumentos cromatográficos no se encuentran disponibles.

El empleo del ELISA con columnas MultiSep # 226 se comparó con el método CLAR-MS y mostró recobrados de 112 y 96 % y RSD_r de 8.2 y 9.8 %, respectivamente; las muestras analizadas brindaron resultados similares (25).

Existen algunos métodos novedosos como son el dispositivo de flujo lateral (DFL), la biosensores (BS). Los DFLs están comercialmente disponibles para la determinación de las aflatoxinas y las fumonisinas en maíz, el DON en trigo, la ocratoxina, la cearamonona, la toxina T-2 y HT-2 en granos de cereales (27). Se ha optimizado el PFL para la determinación del DON en la harina, la sémola y la pasta (28). También se desarrolló un ensayo inmunofluorescente para la determinación del DON y cearamonona en alimento humano y de consumo animal; en el caso del DON se ha alcanzado un límite de detección de 0.0194 ng.mL⁻¹ y un recobrado

de 88-107 %, respectivamente, así como un coeficiente de correlación con el método de ELISA de 0.9733 (29). Los BSs inmunoquímicos que emplean la resonancia de plasmón de superficie (RPS), o los electrodos de carbón impresos, se han aplicado en la detección de micotoxinas en los cereales. Se indica la determinación del DON en trigo a través de un inmunoensayo basado en la RPS competitiva, que omite o no el paso de la purificación y se logra una adecuada correlación entre los valores de concentración hallados por el método de BS y los de referencias, como son CG/MS, CLAR/UV y CLAR/MS/MS (30).

Entre los métodos confirmatorios (Figura 2) la CG se emplea en la determinación simultánea de los tricotecenos usando detección por Captura Electrónica (CE) o de ionización de llama. Esta es una de las

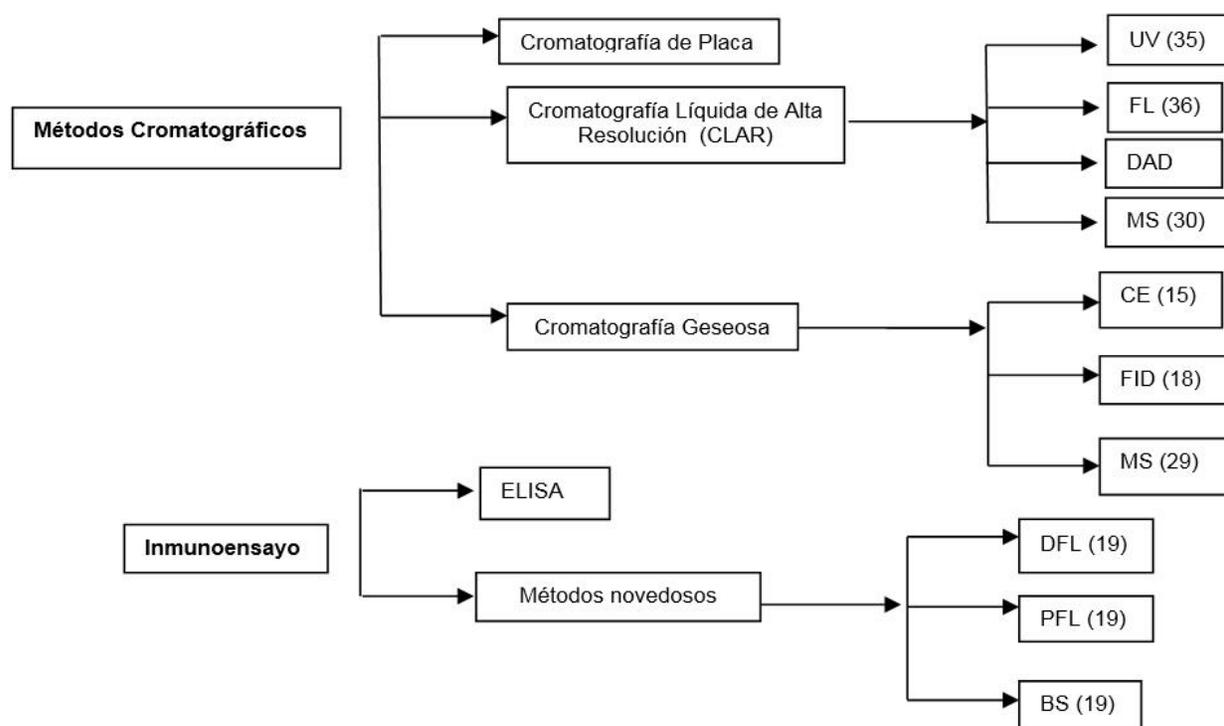


FIGURA 2. Metodologías analíticas empleadas para determinar DON en cereales/*Analytical methodologies used for determinig DON in cereals.*

Leyenda: UV: Ultravioleta; FL: Fluorescente; DAD: Arreglo de diodos; MS: Masa; CE: Captura electrónica; FID: Ionización de llama; DFL: dispositivo de flujo lateral; PFL: polarización fluorescente; BS: biosensores.

metodologías oficiales propuestas (15) para su determinación en trigo. La técnica presenta valores de recobrados que oscilan entre 43-111 % con un CV < 11 % (5). Hay informes de la aplicación de CLAR en la cuantificación del DON en cereales. La separación generalmente se lleva a cabo con columnas de fase reversa C₁₈, acopladas fundamentalmente a fase móvil de metanol/ agua y acetonitrilo/ agua (5), inclusive a mezclas de ácido acético 0.01 %/acetonitrilo (31) y metanol/agua/ acetato de amonio 10mM ajustado a pH= 3 con ácido acético (32). Se considera preferible el empleo de acetonitrilo en vez de metanol en mezclas acuosas, debido a que presenta un valor de corte de absorción en el UV más conveniente: 190 nm vs. 210 nm; como el DON presenta mejor absorción alrededor de 220 nm el valor de corte del acetonitrilo se encuentra más alejado que el del metanol. En su determinación se han empleado detectores ultravioleta (UV), arreglo de diodos (DAD) y fluorescente (FL) (5).

Con relación a la detección CLAR-UV, existe una metodología oficial propuesta por el Comité Europeo de Normalización para cereales y sus productos (33), y respecto a CLAR-FL se ha realizado la derivatización poscolumna con agentes como hidróxido de sodio, metil-aceto-acetato y acetato de amonio; este método muestra excelentes características del desempeño (31). La aplicación de la CLAR ha mostrado buenos resultados en parámetros como: recobrados de 89-110 %, RSD_r < 10 %, RSD_R < 25 % (34,35,36). La espectrometría de masa (MS) es la que más se emplea en la actualidad, tanto acoplada a CG como a CLAR, debido a sus innumerables ventajas: mayor selectividad, menores límites de detección e identificación inequívoca de la sustancia al proveer información estructural (37) que se caracteriza por la determinación simultánea de numerosas micotoxinas, e incluso el DON (35).

Generalmente, en el análisis de la mayoría de los tricotecnos de tipo A y B en cereales por CLAR/MS/MS las interfases más

empleadas son: Ionización Química de Presión Atmosférica y la Ionización Electrospray (34); en el caso del DON se reporta el empleo de espectrometría de triple cuádruplo (38), tiempo de vuelo y Orbitrap (39). Con el uso de diferentes sistemas de extracción y purificación se han alcanzado valores de recobrados de esta micotoxina (principalmente en maíz) que fluctúan entre 66-108 % y detectado a nivel de 10 ngg⁻¹ (37). El empleo de estándares internos marcados, como es el [¹³C₁₅]-DON, ha constituido una ventaja donde se reportan valores de recobrado del 96 %, mucho mayor que el que se obtuvo con la metodología de estándar externo que fue de 49 %, aplicando la misma técnica analítica (40). El JECFA consideró que la novedad más importante para el análisis del DON la representa el uso de espectrometría de masas (MS) o espectrometría de masas en tándem (MS/MS) acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución (LC-MS/MS) (41).

REGULACIONES ESTABLECIDAS PARA LA RESIDUALIDAD DEL DON Y PRESENCIA DE ESTE METABOLITO POR ENCIMA DE LAS ESPECIFICACIONES EN CEREALES DESTINADOS AL CONSUMO ANIMAL

La contaminación de los cereales por micotoxinas, e incluso el DON, ha sido ampliamente estudiada por diversas organizaciones internacionales, entre las que se encuentran UE (12), *Codex Alimentarius* y la FDA (13) (Tabla 1). Ellas han establecido los límites máximos permisibles (LMP) para las toxinas del *Fusarium spp.* en los alimentos dirigidos al consumo animal. En la actualidad, la mayoría de los países tiene políticas de monitoreo de residuos y contaminantes bien instituidas para garantizar la inocuidad de los alimentos que exportan, producen e importan (42).

Aun así, han ocurrido incidentes asociados a concentraciones elevadas del DON, en ocasiones por encima del LMP establecido por las organizaciones reguladoras. El análisis de

TABLA1. Límites máximos permisibles del DON en cereales destinados al consumo animal./*Maximum Permissible Limits of DON in cereals for animal consumption.*

	Deoxivalenol	LMP (μgkg^{-1})
	Materias primas para piensos (**):	
	— Cereales y productos a base de cereales (***), con excepción de los subproductos de maíz	8000
UE*	Subproductos de maíz	12000
	Piensos complementarios y completos, con excepción de:	5000
	Piensos complementarios y completos para cerdos	900
	Piensos complementarios y completos para terneros (menores de cuatro meses), corderos y cabritos	2000
	Granos y productos de granos destinados para la vacas y el ganado mayor de cuatro meses, así como pollos con la recomendación que no exceda el 50 % de la dieta para el ganado y los pollos.	10000
FDA	Granos y productos de granos destinados para cerdos con la recomendación que no exceda el 20 % de la dieta.	5000
	Granos y productos de granos destinados para todos los demás animales con la recomendación que no exceda el 40 % de la dieta	5000
	Trigo molido	2000
Canadá	Raciones para ganado y aves	5000
	Raciones para puercos, novilla y animales en lactación	1000

(*)Para piensos con un contenido de humedad del 12 %. (**) Debe prestarse especial atención a que la utilización de una ración diaria de cereales y productos a base de cereales, como alimento directo de los animales, no suponga exponerlos a un nivel de estas micotoxinas superior a los niveles de exposición correspondientes a un uso exclusivo de piensos completos en una ración diaria. (***) Los términos «cereales y productos a base de cereales» incluyen no solo las materias primas enumeradas bajo el título «1. granos de cereales, sus productos y subproductos» de la Lista no excluyente de las principales materias primas para la alimentación animal de la parte B del anexo de la Directiva 96/25/CE del Consejo, de 29 de abril de 1996, por la que se regulan la circulación y la utilización de las materias primas para la alimentación animal (DO L 125 de 23.5.1996, p. 35), sino también otras materias primas para la alimentación animal derivadas de los cereales, en particular los forrajes y forrajes groseros de cereal.

1255 muestras realizado en Polonia demostró la presencia de alta concentración ($409 - 14\,470 \text{ ngg}^{-1}$) en granos de cereal, forraje y pienso mezclado (43). En China, se encontró que el 88 y el 50 % de las muestras de trigo y maíz, procedentes de siete provincias, resultaron positivas al DON, con un rango de $1.5 - 590.7 \mu\text{gkg}^{-1}$ y $1.6 - 4374.4 \mu\text{gkg}^{-1}$, respectivamente, donde siete muestras de maíz mostraron contaminaciones por encima $1000 \mu\text{gkg}^{-1}$. En esta investigación se concluyó que en el maíz

había más contaminación que en el trigo y se mostró en el siguiente orden: DON, DON-3G, 3ADON y 15ADON (44). En 92 clases de piensos comerciales, provenientes de Sudáfrica, se informó una elevada contaminación, donde se destaca la presencia de fumonisinas, seguido del DON en un rango de $124-2352 \mu\text{gkg}^{-1}$ (45). En Suiza, en el año 2011 se analizaron 20 silos de maíz provenientes de campos con incidencia de *Fusarium. spp.* y micotoxinas y se detectó la

presencia de DON en todas las muestras en un intervalo de 780-2990 μgkg^{-1} (46). En Cuba, en el año 2004 se analizaron muestras de trigo importadas para el consumo animal y se obtuvieron concentraciones del DON por encima de los 1000 μgkg^{-1} (47).

Lo anterior enfatiza la necesidad de realizar monitoreo de las micotoxinas, específicamente del DON; en este caso en los cereales, piensos y otros alimentos elaborados a partir de ellos, sobre todo en los tiempos actuales, en los que, debido al cambio climático, las temperaturas suelen ser más elevadas y los parámetros higrométricos han cambiado, lo que puede favorecer el crecimiento de los hongos y, por tanto, la presencia de las micotoxinas en los cereales, principalmente en países de clima frío (48). Respecto a esto, en el Noroeste de Europa se valoró la influencia del clima sobre la presencia del DON en el trigo hasta el año 2040; para ello se estudiaron diversas variables aplicando modelos predictivos, con lo que se evidenció que la floración y la maduración completas del trigo se adelantarían 1-2 semanas, lo que estaría asociado a un aumento triplicado en la contaminación del DON en relación con el periodo referencial tomado para la confección del modelo. Con esta investigación se demostró el impacto negativo que puede ocasionar el cambio climático y la utilidad de emplear diferentes modelos predictivos en el establecimiento de medidas de monitoreo para sostener la seguridad alimentaria en las cadenas de producción de trigo (49).

TOXICIDAD DEL DEOXINIVALENOL EN ANIMALES DE GRANJA

El DON se considera el tricoteceno del tipo B de menor toxicidad, suele aparecer conjuntamente con el nivalenol (más frecuente), la HT-2 toxina, el diacetoxiscirpenol, la cearenona, la fumonisina, entre otros (50).

En la evaluación de la toxicidad que ocasiona el DON en los animales se han

considerado las influencias de diferentes variables, como son la especie, la edad, el sexo, la vía de administración, la concentración de la micotoxina, entre otras. Según los datos disponibles, todas las especies estudiadas resultan susceptibles al DON en el siguiente orden: cerdo > ratón > rata > aves \approx rumiantes. Esta sensibilidad está determinada, fundamentalmente, por el metabolismo de cada especie. Para que el DON cause la muerte o las lesiones hísticas marcadas en animales de experimentación se requiere de concentraciones muy elevadas ($\geq 27 \text{ mgkg}^{-1}$ de peso corporal -p.c.-); en tanto, las dosis mínimas ($\geq 50 \mu\text{gkg}^{-1}$ p.c.) generan vómitos en cerdos. Los efectos más comunes que aparecen en animales de experimentación ante la exposición prolongada al DON en la dieta son: disminución de la ganancia de peso y la eficiencia nutricional, anorexia y alteración de la función inmune (10). En la [Tabla 2](#) se presentan datos de estudios de toxicidad a corto y mediano plazo, donde se reflejan los efectos provocados por el DON en animales de granja. El cerdo es la especie más susceptible porque la absorción del metabolito ocurre rápidamente (51), aumenta su concentración plasmática en los primeros 30 min de ingestión, con un tiempo de vida media de 3.9 h (52), sumado a que su metabolismo presenta limitaciones en cuanto a la biotransformación del DON hacia un compuesto de epoxidado menos tóxico (DOM-1) (53). Todo lo opuesto sucede en las aves y los rumiantes, quienes pueden tolerar hasta 20 ppm en la dieta; sin embargo, en los cerdos una concentración de 1-2 ppm es suficiente para inducir efectos tóxicos. Los resultados de las investigaciones efectuadas entre 1968 y 2010 mostraron que el DON ejerce una toxicidad significativa en los cerdos, es la responsable de la disminución, tanto del consumo de alimento (26 %) como de la ganancia de peso (16 %); además, se resalta que la afectación del crecimiento era mucho más acentuada en cerdos jóvenes, mientras que en las hembras el efecto era ligeramente menor (54). Los efectos descritos

TABLA 2. Resumen de estudios toxicológicos a corto y mediano plazos del DON en animales de granja/Summary of short and long term toxicity studies of DON in farm animals.

Especie	Sexo/Edad/Cantidad	Tiempo	Administración/Dosis	Efectos	Referencia
Pollos	Machos/7 días	6 semanas	Dieta basal: 0.265 +/- 0.048 mg del DON kg ⁻¹ Dieta baja: 1.68 mg DON kg ⁻¹ Dieta alta: 12.209 +/- 1.149 mg DON kg ⁻¹ .	Disminuyó la ganancia en peso de manera lineal en las primeras tres semanas (P <= 0.041), por lo que no existe diferencia significativa entre las tres semanas restantes.	(66)
Pollos	20 pollos (5 por grupo)	23 días	Dieta: 1.0, 2.5 and 5.0 mg del DON kg ⁻¹ de alimento.	Reducción del consumo y ganancia de peso. A nivel molecular: DON se unió a la subunidad ribosomal 60s inhibiendo la síntesis de proteína a nivel translacional. Todos estos efectos se relacionaron con la alteración de la expresión genética a través de técnicas moleculares.	(67)
Cerdos	6 cerdos por grupo	5 semanas	Dieta: 3 mg kg ⁻¹ de alimento.	Cambios morfológicos e histológicos: atrofia, fusión y disminución de la altura de las vellosidades, proliferación celular en el yeyuno, reducción del número de células caliciformes y linfocitos. Se midieron los niveles de expresión de las citoquinas (TNF-alfa, IL-1beta, IFN-gamma, IL-6 e IL-10) y se mostró que son significativamente reguladas en el íleon o el yeyuno. Se redujo, además, la expresión de la proteínas E-caderina y ocludina en el intestino.	(68)
Cordero	3-4 por grupo	28 días	Dieta: 16 mg kg ⁻¹ .	No se observaron efectos en el consumo de alimento, la ganancia de peso y en los parámetros histológicos, serológicos y hematológicos.	(69)
Caballo	2 grupos de cinco yeguas	15 días	Dieta: 20.2 mg kg ⁻¹ y 0.49 mg kg ⁻¹ , suministrando 2 kg de avena diario	No se observaron efectos adversos en la salud de manera general, pero se produjeron pequeños cambios en el recuento diferencial sanguíneo y la bioquímica sérica (la concentración de haptoglobina sérica fue elevada después del suministro de DON). No se produjo un impacto importante en la respuesta inmune.	(70)
Vacas lecheras (Holstein)	2 por grupos	21 días	Dieta: 0, 2100, 6300, 8500 µg kg ⁻¹ .	No se observaron efectos en el consumo de alimento, la ganancia de peso, el pH ruminal y la producción de leche.	(71)

afectan de manera indirecta su reproducción, debido al deterioro de las funciones del hígado y del bazo, entre otras alteraciones metabólicas (55).

Existen numerosos informes acerca de la resistencia del huésped, la proliferación linfocitaria inducida por mitógenos y la respuesta inmune humoral que se asocian a la influencia que ejercen los tricotecenos sobre el sistema inmune, al cual pueden estimular o inhibir, en dependencia de la dosis, la frecuencia de exposición y el ensayo utilizado (56).

En polluelos de un día de edad, que recibieron en la dieta 18 mgkg^{-1} del DON, se observó una supresión de la respuesta humoral a la vacuna de la enfermedad de Newcastle. En tanto, cuando se suministró el alimento contaminado con 50 mgkg^{-1} la blastogénesis linfocitaria estuvo reprimida (57). En cerdos machos castrados de 6-7 semanas de edad, que consumieron dietas con diferentes niveles ($0-2.8 \text{ mgkg}^{-1}$) de DON enriquecidos con el 25 % de 15-acetilDON y 4 % de cearenona, se constató un retraso de la respuesta de los anticuerpos a los eritrocitos de carneros en los animales expuestos a las dos concentraciones más altas. Al final del experimento se registró una asociación positiva entre leucocitosis y dosis de DON, aparentemente producto a un aumento en el conteo de los neutrófilos; se apreció, además, que la castración puede alterar la sensibilidad de los cerdos (58). En los experimentos efectuados en conejos, con dosis que van desde 7.5 a 240 mgkg^{-1} en la dieta, dieron como resultado un incremento en la reabsorción fetal y la reducción del peso del feto y la madre (59). En gallinas ponedoras, de 20-23 semanas de edad, no se observaron efectos adversos para concentraciones de $0.12-4.9 \text{ mgkg}^{-1}$ de DON en la dieta fortificada con 12 % de 3-acetilDON (60). La administración en la dieta de $0.13-3.5 \text{ mgkg}^{-1}$ del DON, durante los primeros 54 días de gestación en la cerda, produjo la disminución del peso del feto y la toxicidad maternal (61). En estudios realizados *in vivo* en pollos de engorde, con el

suministro de una dieta de 7.54 mg del DONkg^{-1} de alimento durante tres semanas, se produjeron afectaciones en el intestino (duodeno y yeyuno). Mediante técnicas moleculares se observó la regulación de la expresión del ARN mensajero que codifica para la proteína claudina 5 (garantiza la función de la pared intestinal) en el yeyuno, dos marcadores de estrés oxidativo (hemooxigenasa y la xantina-xidoreductasa) en el yeyuno, íleon e hígado en el caso del segundo marcador, así como TLR4 (receptor del epitelio intestinal de procesos inflamatorios) en el duodeno y en yeyuno, lo que conllevó a inflamaciones, fundamentalmente por bacterias Gram negativas (62). Además, este tricoteceno puede ser un factor predisponente para el desarrollo de enfermedades en esta especie animal, como es el caso de la enteritis crónica, debido a los efectos negativos que produce en la función de la pared intestinal y el aumento de la disponibilidad de proteína en la misma, factores que favorecen el crecimiento y la producción de toxinas del *Clostridium Perfringes*, cuando se suministran concentraciones un poco menores que el nivel orientado por la UE de $5000 \text{ } \mu\text{gkg}^{-1}$ de alimento (63). También se investigó la interacción del DON con *Salmonella typhimurium* a través de un modelo intestinal ileal porcino; en este se expresa que la ingesta de concentraciones bajas y pertinentes de esta micotoxina hace al epitelio más susceptible al microorganismo con una potenciación de la inflamación del intestino (64).

El potencial genotóxico del DON se demostró mediante la aplicación de 10 mg del DONkg^{-1} de alimento bajo en proteínas en pollos de un día de nacido. En este se evaluó la fragmentación del ADN en los linfocitos por el ensayo cometa y se demostró que el daño provocado en el ADN fue por la acción directa de esta micotoxina o a través de mecanismos epigenéticos, como la formación de aductos (65). En cuanto a la posible acción carcinogénica del DON, la Agencia

Internacional de Investigación del Cáncer sentenció en 1993 que no existían evidencias adecuadas en animales de experimentación para atribuirle un efecto carcinogénico, razón por la cual se ubica en el grupo 3. Posteriormente, en un estudio de dos años de duración en ratones sometidos a una dieta contaminada con el DON no pudo demostrarse la presencia de neoplasias; se observó en los ratones machos una disminución de la incidencia de hepatomas, probablemente debido a la disminución del peso corporal. No obstante, otro experimento con ratones NIH a los que se suministró el DON, a través de una intubación gástrica ($1.5 \mu\text{gKg}^{-1}\text{p.c.}$ 3 veces a la semana durante 24 semanas), dio como resultado la inducción del adenocarcinoma del pulmón en 37.5 % y la displasia glandular estomacal en 25 % (50).

CONCLUSIONES

Existen varios métodos oficiales para la determinación de DON en cereales: la CP, la CLAR-UV, la CG; no obstante, cuando se necesita establecer un programa de residuos y contaminantes a través de organismos reguladores se debe realizar la confirmación del analito, y es entonces donde juega un papel importante la técnica de CLAR acoplada a Masa, considerada por la JECFA como el método novel más importante que se aplica para este análisis. Hasta el momento, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer clasifica el

DON como una sustancia que pertenece al grupo 3 (no clasificable como carcinógeno en seres humanos), lo que posibilita que se establezcan en cereales para consumo animal LMPs que oscilan entre $1000\text{-}12000 \mu\text{gkg}^{-1}$, según el alimento, la especie y el estado del animal. Sin embargo, diferentes organizaciones internacionales manifiestan la necesidad de contar con más datos y estudios toxicológicos que posibiliten evaluar el potencial carcinogénico de esta toxina.

Se han realizado experimentos de corta y mediana duración en animales de granja,

donde el DON se ha suministrado a través de la dieta y se ha observado disminución del consumo de alimento y la ganancia en peso, entre otras afectaciones. La especie que ha resultado más sensible es el cerdo y las más resistentes los rumiantes y las aves, diferencia que está condicionada por el mecanismo metabólico que atraviesa la toxina dentro del huésped.

REFERENCIAS

1. Graziano dSJ. Informe sobre el hambre 2011. (cited 2010 ener 10) available from:<http://www.fao.org/hunger/es/>.
2. FAO. Perspectivas de cosechas y situación alimentaria. Noticias más importantes. Sistema mundial de información y alerta sobre la alimentación y la agricultura (SMIA). 2012(2).
3. Cuba CE. Comercio Exterior de Cuba de NCE Cereales Servicio de búsqueda de Negocios TRADENOSISCOM. 2012.
4. Steyn P. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol Lett.* 1995;82/83:843-851.
5. (IPCS) IPoCS. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. 2001.
6. Mendez A, Moreno E. Las micotoxinas, contaminantes naturales de los alimentos. [Comunicación Libre]. 2009.
7. Josephs RD, Derbyshire M, Stroka J. Trichothecenes: reference materials and method validation. . *Toxicology Letters.* 2001;153:23-132.
8. Foroud NA, Eudes F. Trichothecenes in Cereal Grains. *International Journal of Molecular Sciences.* 2009 Jan;10(1):147-173.
9. Rotter BA, Prelusky DB, Pestka JJ. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *Journal of Toxicology and Environmental Health.* [Review]. 1996 May;48(1):1-34.
10. Pestka JJ. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. *Animal Feed Science and Technology.* 2007;137(3-4):283-298.

11. Zollner P, Mayer-Helm. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1136:123-169.
12. Union E. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2006;L 364:5-24.
13. Administration FD. Feed Contaminants Programs. 2005.(cited 2010 ener 10) available from:<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/ComplianceEnforcement/ucm113409.pdf>.
14. Oueslati S, Romero-Gonzalez R, Lasram S, Frenich AG, Vidal JL. Multi-mycotoxin determination in cereals and derived products marketed in Tunisia using ultra-high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food and chemical toxicology an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2012 Jul;50(7):2376-2381.
15. AOAC. AOAC method 986.18. Deoxynivalenol in wheat *Gas Chromatography Method*. 2010a.
16. AOAC. AOAC Official Methods 986.17, Deoxynivalenol in wheat. *Thin-Layer Chromatography Method*. 2010b.
17. Shephard GS. Determination of mycotoxins in human foods. *Chem Soc Rev* 2008;37:2468-2477.
18. Pascale M. Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products. *Zbornik Matice srpske za prirodne nauke*. 2009(117):15-25.
19. Pascale M, Visconti A. Overview of detection methods for mycotoxins. In: Leslie, J. F., Ba ndyopadhyay, R., Visconti, A Eds., *Mycotoxins — Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural*. CAB International, UK. 2008:171-183.
20. Abramović B, Jajić I, Jurić V, Gaál FF. Optimization of the determination of deoxynivalenol in corn samples by liquid chromatography and a comparison of two clean-up principles. *J Serb Chem Soc*. 2005;70(7):1005–1013.
21. Pascale M, De Girolamo A, Visconti A, Magan N, Chianella I, Piletska EV. Use of itaconic acid-based polymers for solid-phase extraction of deoxynivalenol and application to pasta analysis. *Anal Chim Acta* 2008 (a);609:131-138.
22. Heidtmann-Bemvenuti R, Cristina dos Santos Hackbart H, Moraes de Souza M, Badiale-Furlong E. Determinação de deoxinivalenol e zearalenona em arroz natural e parboilizado e suas frações utilizando quechers e HPLC/UV-FL. *Quim Nova*. 2012;35(6):1244-1249.
23. Cunha SC, Fernandes JO. Development and validation of a method based on a QuEChERS procedure and heart-cutting GC-MS for determination of five mycotoxins in cereal products. *Journal of separation science*. [Research Support, Non-U.S. Gov't Validation Studies]. 2010 Mar;33(4-5):600-609.
24. Rubert J, Dzuman Z, Vaclavikova M, Zachariasova M, Soler C, Hajslova J. Analysis of mycotoxins in barley using ultra high liquid chromatography high resolution mass spectrometry: comparison of efficiency and efficacy of different extraction procedures. *Talanta*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Sep 15;99:712-719.
25. Hiroaka H, Yamamoto K, Mori Y, Asao N, Fukunaka R, Deguchi K, et al. Modified use of a comercial ELISA kit for deoxynivalenol determination in rice and corn silage. *Micotoxin Res*. 2012.
26. Park j, Chu FS. Assessment of inmunochemical methods for the analysis

- of trichothecenes mycotoxins in naturally occurring moldy corn. *J AOAC Int.* 1996;79:465-471.
27. Krska R, Molinelli A. Rapid test strips for analysis of mycotoxins in food and feed. *Anal Bioanal Chem.* 2009;393:67-71.
28. Pascale M, Lippolis V, Maragos CM, Visconti A. Recent developments in trichothecene analysis. In: Siantar, D. P., Trucksess, M.W., Scott P. M., Herman, E. M. Eds., ACS Symposium Series 1001 — Food Contaminants: Mycotoxins and Food Allergens, American Chemical Society, Washington, DC. 2008 (b):192-210.
29. Zhang J, Gao L, Zhou B, Zhu L, Zhang Y, Huang B. Simultaneous detection of deoxynivalenol and zearalenone by dual-label time-resolved fluorescence immunoassay. *Journal of the science of food and agriculture.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Validation Studies]. 2011 Jan 30;91(2):193-197.
30. Prieto-Simon B, Noguer Y, Campas M. Emerging biotools for assessment of mycotoxins in the past decade. *TrAC, Trends Anal Chem* 2007;26:689-702.
31. Muscarella M, Iammarino M, Nardiello D, Palermo C, Centonze D. Determination of deoxynivalenol and nivalenol by liquid chromatography and fluorimetric detection with on-line chemical post-column derivatization. *Talanta.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Aug 15;97:145-149.
32. De Boevre M, Di Mavungu JD, Maene P, Audenaert K, Deforce D, Haesaert G, et al. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't Validation Studies]. 2012;29(5):819-835.
33. CEN. Methods TCCTFa-H. European Standard 15891: Foodstuffs — Determination of deoxynivalenol in cereals, cereal products and cereal based foods for infants and young children — HPLC method with immunoaffinity column cleanup and UV detection Austrian Standards Institute. 2010.
34. Berthiller F, Dall'Asta C, Schuhmacher R, Lemmens M, Adam G, Krska R. Masked mycotoxins: determination of a deoxynivalenol glucoside in artificially and naturally contaminated wheat by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of agricultural and food chemistry.* [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2005 May 4;53(9):3421-3425.
35. Streit E, Schwab C, Sulyok M, Naehrer K, Krska R, Schatzmayr G. Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. *Toxins.* 2013 Mar;5(3):504-523.
36. Aoyama K, Akashi H, Mochizuki N, Ito Y, Miyashita T, Lee S, et al. Interlaboratory study of LC-UV and LC-MS methods for the simultaneous determination of deoxynivalenol and nivalenol in wheat. *Shokuhin eiseigaku zasshi Journal of the Food Hygienic Society of Japan.* [Research Support, Non-U.S. Gov't Validation Studies]. 2012;53(3):152-156.
37. Bunaciu D. Developing an HPLC-ESI-MS/MS method for simultaneous determination of mycotoxins in maize flour and other matrices. [Tesis de Maestría]. 2010.
38. Lattanzio VM, Gatta SD, Godula M, Visconti A. Quantitative analysis of mycotoxins in cereal foods by collision cell fragmentation-high-resolution mass spectrometry: performance and comparison with triple-stage quadrupole detection. Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. [Comparative

- Study Validation Studies]. 2011 Oct;28(10):1424-1437.
39. Lehner SM, Neumann NK, Sulyok M, Lemmens M, Krska R, Schuhmacher R. Evaluation of LC-high-resolution FT-Orbitrap MS for the quantification of selected mycotoxins and the simultaneous screening of fungal metabolites in food. Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. [Evaluation Studies Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Oct;28(10):1457-1468.
 40. Varga E, Glauner T, Koppen R, Mayer K, Sulyok M, Schuhmacher R, et al. Stable isotope dilution assay for the accurate determination of mycotoxins in maize by UHPLC-MS/MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012 Mar;402(9):2675-2686.
 41. JECFA. Evaluation of certain food additives and contaminants. (Report of the seventy-second meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)). . WHO Technical Report Series. 2010;958.
 42. Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN). Nota informativa de INFOSAN No. 1/2009 – Vigilancia de productos químicos en los alimentos. 2009:1-5.
 43. Grajewski J, Blajet-Kosicka A, Twaruzek M, Kosicki R. Occurrence of mycotoxins in Polish animal feed in years 2006-2009. Journal of animal physiology and animal nutrition. 2012 Oct;96(5):870-877.
 44. Li FQ, Yu CC, Shao B, Wang W, Yu HX. [Natural occurrence of masked deoxynivalenol and multi-mycotoxins in cereals from China harvested in 2007 and 2008]. Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Jan;45(1):57-63.
 45. Njobeh PB, Dutton MF, Aberg AT, Haggblom P. Estimation of multi-mycotoxin contamination in South African compound feeds. Toxins. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Oct;4(10):836-848.
 46. Eckard S, Wettstein FE, Forrer HR, Vogelgsang S. Incidence of Fusarium species and mycotoxins in silage maize. Toxins. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2011 Aug;3(8):949-967.
 47. Escobar A, Fragas I. Determinación de deoxinivalenol (vomitoxina) en muestras de trigo por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Rev Salud Anim. 2004;26(2):116-120.
 48. Bernhoft A, M T, Clasena P-E, Løesb A-K, Kristoffersena AB. Influence of agronomic and climatic factors on Fusarium infestation and mycotoxin contamination of cereals in Norway. Food Additives and Contaminants. 2012;29(7):1129-1140.
 49. Van der Fels-Klerx HJ, Olesen JE, Madsen MS, Goedhart PW. Climate change increases deoxynivalenol contamination of wheat in north-western Europe. Food additives & contaminants Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment. 2012;29(10):1593-1604.
 50. Program. NT, Sciences. NIOEH, Health. NIO, Services. USDoHaH, Research Triangle Park N. Chemical Information Review Document for Deoxynivalenol [CAS No. 51481-10-8]. 2009.
 51. Prelusky DB, Hartin KE, Trenholm HL, Miller JD. Pharmacokinetic fate of 14C-labeled deoxynivalenol in pigs. Fundam Appl Toxicol 1988. ;10:276-286.
 52. Prelusky DB, Trenholm HL. Tissue distribution of deoxynivalenol in pigs dosed intravenously. . J Agric Food Chem. 1991b.; 39:748-752.
 53. Qinghua W, Vlastimil D, Lingli H, Kamil K, Zonghui Y. Metabolic pathways of trichothecenes. Drug Metabolism Reviews. 2010;42(2):250-267.
 54. Andretta I, Kipper M, Lehnen CR, Hauschild L, Vale MM, Lovatto PA. Meta-analytical study of productive and

- nutritional interactions of mycotoxins in growing pigs. *Animal : an international journal of animal bioscience*. [Meta-Analysis]. 2012 Sep;6(9):1476-1482.
55. Tiemann U, S. D. In vivo and in vitro effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: A review. *Food Additives and Contaminants*. 2007;24(3):306-314.
56. Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol Lett*. 2004;153:61-73.
57. Harvey RB, Kubena LF, Huff WE, Elissalde MH, Phillips TD. Hematologic and immunologic toxicity of deoxynivalenol (DON)-contaminated diet to growing chickens. *Bull Environ Contam Toxicol*. 1991;46:410-416.
58. Greene D, Azcona-Olivera J, Pestka J. Volitoxin (deoxynivalenol) induced IgA nephropathy in the B6C3F1 mouse: Dose-repose and male predilection. *Toxicology*. 1994;92:245-260.
59. Khera KS, Whalen C, Angers G. A teratology study on vomitoxin (4-deoxynivalenol) in rabbits. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 1986 May;24(5):421-424.
60. Bergsjö B, Herstad O, Nafstad I. Effects of feeding deoxynivalenol-contaminated oats on reproduction performance in White Leghorn hens. *British poultry science*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 1993 Mar;34(1):147-159.
61. Friend DW, Trenholm HL, Fiser PS, Thompson BK, Hartin KE. Effect on dam performance and fetal development of deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat in the diet of pregnant gilts. *Can J Anim Sci*. 1983;63:689-698.
62. Osselaere A, Santos R, Hautekiet W, De Backer P, Chiers K, Ducatelle R, et al. Deoxynivalenol Impairs Hepatic and Intestinal Gene Expression of Selected Oxidative Stress, Tight Junction and Inflammation Proteins in Broiler Chickens, but Addition of an adsorbing Agent Shifts the Effects to the Distal Parts of the Small Intestine. *PLoS ONE*. 2013;8(7):e69014.
63. Antoniessen A, Immerseel P, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F, Timbermont L, et al. The Mycotoxin Deoxynivalenol Predisposes for the Development of Clostridium perfringens-Induced Necrotic Enteritis in Broiler Chickens. *PLoS ONE*. 2014;9(9):e108775.
64. Vandebroucke V, Croubels S, Martel A, Verbrugghe E, Goossens J, Van Deun K, et al. The Mycotoxin Deoxynivalenol Potentiates Intestinal Inflammation by Salmonella Typhimurium in Porcine Ileal Loops. *PLoS ONE*. 2011;6(8):e23871.
65. Awad WA, Ghareeb K, Dadak A, Gille L, Staniek K, Hess M, et al. Genotoxic effects of deoxynivalenol in broiler chickens fed low-protein feeds. *Poultry Science*. 2012;91:550-555.
66. Yunus AW, Blajet-Kosicka A, Kosicki R, Khan MZ, Rehman H, Bohm J. Deoxynivalenol as a contaminant of broiler feed: intestinal development, absorptive functionality, and metabolism of the mycotoxin. *Poultry science*. 2012 Apr;91(4):852-861.
67. Dietrich B, Neuenschwander S, Bucher B, Wenk C. Fusarium mycotoxin-contaminated wheat containing deoxynivalenol alters the gene expression in the liver and the jejunum of broilers. *Animal : an international journal of animal bioscience*. [Comparative Study Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Feb;6(2):278-291.
68. Bracarense AP, Luciola J, Grenier B, Drociunas Pacheco G, Moll WD, Schatzmayr G, et al. Chronic ingestion of deoxynivalenol and fumonisin, alone or in interaction, induces morphological and immunological changes in the intestine of

- piglets. *The British journal of nutrition*. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2012 Jun;107(12):1776-1786.
69. Harvey RB, Edrington TS, Kubena LF, Elissalde MH, Casper HH, Rottinghaus GE, et al. Effects of dietary fumonisin B1-containing culture material, deoxynivalenol-contaminated wheat, or their combination on growing barrows. *American journal of veterinary research*. 1996 Dec;57(12):1790-1794.
70. Parisini A, Hellweg P, Razzazi-Fazeli E, Saalmuller A, Strasser A, Tichyd A, et al. Highly deoxynivalenol contaminated oats and immune function in horses. *Archives of Animal Nutrition*. 2012;66(2):149–161.
71. Ingals J. Influence of deoxynivalenol on feed consumption by dairy cows. *Anim Feed Sci Technol*. 1996;60(297-300).